

GISLAINE BORBA OLIVEIRA

***ESTUDO DA APOPTOSE ESPONTÂNEA NA LEUCEMIA
LINFÓIDE CRÔNICA (LLC) E SUAS RELAÇÕES COM OS
PARÂMETROS CLÍNICOS E CITOCINÉTICOS***

CAMPINAS

2002

GISLAINE BORBA OLIVEIRA

***ESTUDO DA APOPTOSE ESPONTÂNEA NA LEUCEMIA
LINFÓIDE CRÔNICA (LLC) E SUAS RELAÇÕES COM OS
PARÂMETROS CLÍNICOS E CITOCINÉTICOS***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para Obtenção de Título de Mestre
em Clínica Médica, área de Clínica Médica.*

ORIENTADOR: PROF^A IRENE LORAND-METZE

CAMPINAS

2002

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C547f Oliveira, Gislaine Borba
 Estudo da apoptose espontânea na leucemia linfóide crônica (LLC)
e suas relações com os parâmetros clínicos e citocinéticos / Gislaine
Borba Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

 Orientador : Irene Lorand Metze
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Citometria de Fluxo . 2. Proliferação celular. 3. Anexina V .
4. AgNOR. I. Irene Lorand Metze. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Aluno: *GISLAINE BORBA OLIVEIRA*

Orientador(a): *Profa.Dra. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze* _____

Membros: _____

Professor Doutor Roberto Passeto Falcão _____

Professor Doutor Cármino Antonio de Souza _____

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 25/06/02

00821045

DEDICATÓRIA

*Para José, Marisa e Ivani, como retribuição de
todo amor, carinho e compreensão.*

Ao meu pai, José: o melhor pai, o melhor amigo, agradeço por todo amor, carinho e atenção que têm me dedicado desde o início de minha existência. Mesmo sem palavras ou atitudes drásticas, soube transmitir seriedade, respeito e, principalmente, dignidade.

À minha mãe, Marisa: agradeço pelo carinho, seriedade e por sua preocupação com a minha formação pessoal e profissional, sempre transmitindo responsabilidade, mesmo nas pequenas coisas.

À minha irmã Ivani: única como irmã e como pessoa; exemplo de vida, de luta e de coragem. Sempre pronta a (me) fazer sorrir, mesmo que sua vontade seja oposta. Obrigado por ter tido a oportunidade de ser sua irmã e aprender contigo todos os dias – precisaria várias vidas para aprender tudo!! Te adoro!

Ao Vagner: agradeço por todo o sentimento dispensado desde que nossos caminhos se encontraram: carinho, compreensão e ...paciência.

À Dra Irene: meus sinceros agradecimentos por sua orientação, disciplina e preocupação com o desenvolvimento deste projeto e pela sua participação desde o início de minha formação profissional e científica. Agradeço também pela amizade e pelo respeito.

À Fernanda: obrigado por sua importante contribuição no desenvolvimento deste projeto, por sua incansável presença em todos os experimentos e pela amizade que desenvolvemos ao longo destes anos.

Ao Dr. Konradin: pelo desenvolvimento estatístico deste trabalho e pela ajuda nos diferentes momentos desta trajetória.

Ao Aranha: amigo e irmão mais velho; às vezes, mais novo. Não caberia em poucas linhas, páginas ou capítulos, as palavras para agradecê-lo por tudo desde que te conheci.

Ao Afonso: agradeço por sua participação no meu desenvolvimento científico, por sua amizade e pela agradável convivência profissional do dia a dia, sempre pronto a esclarecer as eventuais dúvidas. Meu sincero respeito à sua pessoa!

Ao Dr. Cármino: agradeço pela sua contribuição na minha formação profissional, pelo respeito e pelas oportunidades que tem me oferecido na minha vida profissional.

À Katia Eid e Fernanda pela força nestes últimos momentos.

Às amigas Margareth e Elvira : companheiras há anos nesta luta incessante da satisfação profissional e do reconhecimento científico, agradeço por nossa amizade e irmandade. A luta continua...

À Fabíola: grande pessoa e excelente profissional. Agradeço pelas palavras e pela presença nos momentos adversos, tanto para mim quanto para você. O tempo, não a autoridade, vai ser capaz de responder nossas grandes questões...

À Katinha: por sua amizade e disponibilidade desde o momento em que optei pela hematologia e pelo convívio com seu incansável entusiasmo com a vida...

Aos amigos Iara e Pedro, Silvana e Alessandro: pela agradável amizade e convivência destes longos anos, pela companhia de nossas viagens e que a vida nos permita continuar compartilhando os prazeres dela.

À Marcelinha: pela nossa amizade que iniciou no convívio da medicina e se estendeu para além do âmbito profissional. Agradeço pela presença e pelos conselhos nessa caminhada...

À Nicete, secretária, por sua atenção e paciência, sabendo atender a todos simultaneamente e com extrema dedicação.

Ao Roberto Zulli: por sua calma, tranquilidade e atenção que nos dispensa, mesmo quando a matemática não consegue validar nosso trabalho.

À Arlete: que mesmo de longe, consegue sempre estar presente

Às funcionárias da coleta Esmeraldina, Vera, Nélia e Marlene, que colaboraram muito para que as amostras conseguissem chegar ao laboratório em tempo mínimo.

Ao Luís Carlos : por sua importante colaboração, a qualquer momento, na elaboração da arte final deste trabalho.

MAL SECRETO

*Se a cólera que espuma, a dor que mora
N'alma, e destrói cada ilusão que nasce,
Tudo o que punge, tudo o que devora
O coração, no rosto se estampasse;*

*Se se pudesse o espírito que chora
Ver através da máscara da face,
Quanta gente, talvez, que inveja agora
Nos causa, então piedade nos causasse!*

*Quanta gente que ri, talvez, consigo
Guarda um atroz, recôndito inimigo,
Como invisível chaga cancerosa!*

*Quanta gente que ri, talvez existe,
Cuja a ventura única consiste
Em parecer aos outros venturosa!*

Raimundo Correa

	PÁG.
RESUMO	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
INTRODUÇÃO	18
LLC.....	19
Apoptose.....	31
AgNOR.....	36
OBJETIVOS	38
PACIENTES E MÉTODOS	40
Pacientes.....	41
Avaliação clínica.....	41
Avaliação laboratorial.....	41
Estadiamento de RAI.....	42
Estadiamento de BINET.....	43
Índice de massa tumoral.....	44
Índex prognóstico.....	44
Material clínico.....	46

Preparação e cultura de linfócitos.....	46
Viabilidade celular em câmara de Neubauer.....	47
Microscopia óptica.....	47
Teste da anexina V.....	47
Análise da proliferação celular por agNOR.....	51
Análise estatística.....	53
RESULTADOS.....	55
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

LLC	Leucemia Linfóide Crônica
CD	Clusters de diferenciação
κ	Kappa
λ	Lambda
TNF	Fator de necrose tumoral
RB-1	Retinoblastoma-1
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
AMPc	Monofosfato de adenosina
PI	Iodeto de propídeo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
PE	Ficoeritrina
AgNOR	Regiões organizadoras de nucléolo
TTM	Índice de massa tumoral
TDL	Tempo de duplicação linfocitária

	PÁG.
Tabela 1: Critérios diagnósticos da LLC.....	22
Tabela 2: Estadiamento clínico segundo os critérios de RAI.....	42
Tabela 3: Estadiamento clínico segundo os critérios de Binet.....	43
Tabela 4: Índice de massa tumoral (TTM).....	44
Tabela 5: Índice prognóstico.....	44
Tabela 6: Critérios de tratamento da LLC.....	45
Tabela 7: Características clínicas e de estadiamento dos pacientes.....	57
Tabela 8: Mediana e variação das dosagens de hemoglobina, contagem de leucócitos, linfócitos, plaquetas e células CD8+.....	57
Tabela 9 Correlações entre a porcentagem de células Anexina V+ e os parâmetros clínicos, laboratoriais e de proliferação dos pacientes.....	59
Tabela 10: Correlações entre a porcentagem de células CD8+ e os parâmetros clínicos, laboratoriais e de proliferação dos pacientes.....	61

	PÁG.
Figura 1: Histogênese da LLC.....	21
Figura 2: Interações envolvendo as células da LLC-B, o microambiente e as citocinas no processo de apoptose.....	30
Figura 3: Mecanismos envolvidos na apoptose.....	34
Figura 4: Dotplot da Anexina V/PI.....	50
Figura 5: Configuração das AgNORs na LLC.....	52
Figura 6: Relação entre a contagem de linfócitos periféricos (eixo x) e a % de células Anexina V+ (eixo y).....	60
Figura 7: Relação entre a contagem de linfócitos periféricos e a contagem de células CD8+.....	62
Figura 8: Relação entre o TTM e a % de células com 1 cluster de AgNOR, com a criação de três grupos, de acordo com a % de células Anexina V+.....	63



RESUMO

Estudo da apoptose espontânea na leucemia linfóide crônica (LLC) e sua correlação com os parâmetros clínicos e citocinéticos.

A leucemia linfóide crônica apresenta grande variabilidade na sua apresentação e evolução clínica, bem como, na sua resposta ao tratamento. Estudando a apoptose destas células in vivo, observou-se que ela se encontra bloqueada, o que não ocorre após a cultura a curto prazo, onde este processo acontece espontaneamente. Neste estudo, avaliamos o grau de apoptose in vitro e suas interações com alguns parâmetros clínicos e laboratoriais. Foram avaliados a idade, o estágio clínico segundo os critérios de Rai e Binet, índice de massa tumoral (TTM) e os seguintes parâmetros laboratoriais: hemoglobina (g/dl), contagem de leucócitos, linfócitos e plaquetas (/l), a porcentagem de células com cluster de AgNOR, a porcentagem de células positivas para a Anexina V, o índice e o número absoluto de células CD8 positivas. A apoptose foi medida através da técnica da Anexina V e a taxa de proliferação através da técnica das AgNORs. Houve correlação inversa entre a porcentagem de células positivas para a Anexina V e a contagem de linfócitos periféricos ($r=-0,49$), com o estágio de Rai ($r=-0,40$), com o estágio de Binet ($r=-0,50$), com o TTM ($r=-0,51$) e com a porcentagem de células com um cluster de AgNOR ($r=-0,45$). As correlações diretas ocorreram com os valores de hemoglobina ($r=0,34$) e de plaquetas ($r=0,52$). O número de células CD8 positivas mostrou correlação com a contagem de linfócitos periféricos ($r=0,49$). Quando esta variável foi mantida constante, foi possível detectar uma correlação entre a contagem de células CD8 positivas e o estágio clínico ($r=-0,47$), com o TTM ($r=-0,42$) e com a contagem de plaquetas ($r=0,67$). Os linfócitos CD4 positivos apresentaram uma correlação somente com os linfócitos CD8 positivos. Na análise de clusters, foi possível a criação de três grupos de pacientes com diferentes taxas de apoptose, utilizando os valores do TTM e dos clusters de AgNOR. Portanto, nos foi permitido concluir com este trabalho que, com a progressão da doença, ocorre o aumento da massa tumoral e da taxa de proliferação paralelamente ao aumento da susceptibilidade à apoptose.



ABSTRACT

Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and its relationship to clinical and cell kinetic parameters

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) presents considerable variability in clinical presentation as well as in its evolution. In contrast to the inhibition of apoptosis in vivo, spontaneous apoptosis after short-term culture occurs. We studied the degree of this apoptosis in vitro, and its interactions with several clinical and laboratory parameters. Apoptosis was measured by the annexin V technique. Proliferation rate was evaluated by the AgNOR (nucleolar organizer regions) technique. There were inverse correlations between the percentage of annexin V-positive cells and peripheral lymphocyte count ($r=-0,49$), Rai stage ($r=-0,40$), Binet stage ($r=-0,50$), TTM (total tumor mass score; $r=-0,51$), and percentage of cells with one AgNOR cluster ($r=-0,45$). Direct correlations were found with hemoglobin values ($r=0,34$) and platelet counts ($r=0,52$). The number of CD8positive cells showed a correlation with peripheral lymphocyte count ($r=0,49$). When this variable was held constant, a correlation was detected between CD8-positive cells and staging ($r=-0,47$), TTM ($r=-0,42$), and platelet count ($r=0,67$). CD4-positive lymphocytes presented a correlation only with CD8-positive lymphocytes. In a cluster analysis, it was possible to create three groups of patients with different apoptosis rate using the TTM and AgNOR values. We conclude that, with the progression of the disease, together with the increase of tumor mass and proliferation rate, there is a decrease in the susceptibility to apoptosis.



INTRODUÇÃO

A *leucemia linfóide crônica (LLC)* é uma doença neoplásica caracterizada pela proliferação e acúmulo de linfócitos B no sangue, medula óssea e tecidos linfóides. Consiste na forma mais comum de leucemia da idade adulta no ocidente e corresponde a 25% de todos os casos de leucemia (BYRD, 1998). É descrita uma incidência média de 3 a 5 casos novos/100.000 pessoas/ano nos Estados Unidos; ligeiramente mais frequente em homens que mulheres (1,5 a 2:1) e a maioria dos pacientes com idade superior a 50 anos (DIGHIERO, 1991; FONN, 1990). A etiologia da doença ainda não está elucidada, porém fatores genéticos e familiares podem exercer uma influência no seu surgimento. Alguns estudos relatam um aumento de duas a sete vezes no risco de desenvolver a doença entre familiares de primeiro grau (GUNZ, 1977) e é descrito também a ocorrência do fenômeno de antecipação na LLC, onde o surgimento da doença ocorre cada vez mais precocemente nas gerações subsequentes (HORWITZ, 1996; WIERNIK, 2001).

As características clínicas da LLC são devidas ao acúmulo de células leucêmicas na medula óssea e órgãos linfóides e aos fenômenos imunes associados. Vários fatores parecem contribuir para a gênese da doença. Ela decorre da proliferação aumentada de células linfóides maduras que expressam pequenas quantidades de imunoglobulina de superfície, uma única cadeia leve, kappa ou lambda, coexpressam um antígeno associado à linhagem T, o CD 5 e antígenos relacionados ao sistema HLA-DR e à linhagem B, como o CD19 e o CD 20. Apresentam receptores para hemáceas de camundongo e produzem autoanticorpos polirreativos. Estes fenômenos ocorrem devido à expansão policlonal de linfócitos B CD5+ que, sobre a influência de fatores diversos, levam à proliferação monoclonal destas células. Um importante fator envolvido neste processo é a mutação do gene da cadeia pesada de imunoglobulina, presente em mais de 50% dos casos. Nos casos onde esta mutação está presente, a célula envolvida parece ser o linfócito B de memória que, ao passar pelo centro germinativo, sofre mutação nesta região, dando origem a uma população de linfócitos B CD5+, anérgicos e produtores de autoanticorpos polirreativos e de baixa afinidade. Quando esta mutação está ausente, a célula envolvida parece ser o linfócito B virgem, que não passou pelo centro germinativo e não sofreu estimulação externa. Esta célula sofre estimulação pelos autoantígenos, induzindo a população de linfócitos B CD5 negativos a expressarem este antígeno de superfície (CALIGARIS-CAPPIO, 2001). Estes linfócitos B neoplásicos CD5+ se acumulam devido à inibição da

apoptose, o que pode ser explicado pela superexpressão do gene bcl-2 nestas células, presente em mais de 85% dos casos (SCHENA, 1992). Algumas citocinas parecem estar envolvidas na proliferação e diferenciação destas células, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), o interferon α e γ , as interleucinas 2, 4, 6, e 10. A superexpressão do oncogene c-myc, as deleções nas regiões teloméricas do gene do retinoblastoma (RB-1) e as mutações no gene supressor de tumor p-53 parecem estar relacionados aos casos de progressão de doença.

A apresentação da doença é variada. Cerca de 60% dos casos são assintomáticos ao diagnóstico (ROZMAN, 1995), porém alguns podem evoluir com linfoadenomegalia generalizada e/ou hepatoesplenomegalia e presença de sintomas B. Na avaliação laboratorial encontramos leucocitose às custas de linfócitos maduros e à histologia da medula óssea, celularidade normal ou aumentada, com padrão de infiltração intersticial, nodular ou difusa. Este último padrão é responsável pela diminuição dos precursores eritróides, mielóides e megacariocíticos da medula óssea.

O diagnóstico é firmado através de 3 parâmetros: linfocitose absoluta no sangue periférico acima de 5×10^9 /litro (NCI/Working Group) consistindo de células maduras e mantida por mais de 4 semanas; avaliação medular mostrando infiltração linfocitária superior a 30%; estudo imunofenotípico confirmando a monoclonalidade B. As células da LLC B apresentam co-expressão de um anticorpo Pan T (CD 5) e todos os antígenos de membrana típicos das células B maduras (CD 19, CD 20 e CD 24)(CHESON, 1988; CALIGARIS-CAPIO, 1993; GALE, 1994; SCHROEDER, 1994; DIGIUSEPPE, 1998). Estas células expressam também antígenos da classe II do MHC e HLA-DR e graus variados de CD 25 (anticorpo anti receptor de IL 2) (O'BRIEN, 1995; ROZMAN, 1995; ALLEN, 1993; FAGUET, 1994; MONTSERRAT, 1997; HARRIS, 1994), CD 23 (marcador de ativação), CD 11 (anticorpo anti $\beta 2$ integrina) e moléculas de adesão de superfície (CD 54, CD 58 e L-selectina). Estas células formam rosetas com células de camundongo e algumas podem conter receptores para os fragmentos Fc, IgG e complemento. Morfologicamente, os linfócitos da LLC-B são semelhantes aos pequenos linfócitos B em repouso metabólico, porém estes apresentam marcadores celulares de ativação, como o CD23 e o CD25, mostrando que estas células se encontram num estágio

intermediário de maturação e da diferenciação celular B (Fig. 1). A população linfocitária normal que corresponde à LLC constitui-se de linfócitos maduros CD5+ presentes na zona do manto dos linfonodos e também em pequeno número no sangue periférico (CALIGARIS-CAPPIO, 1996). Os critérios necessários para o diagnóstico são mostrados na tabela 1.

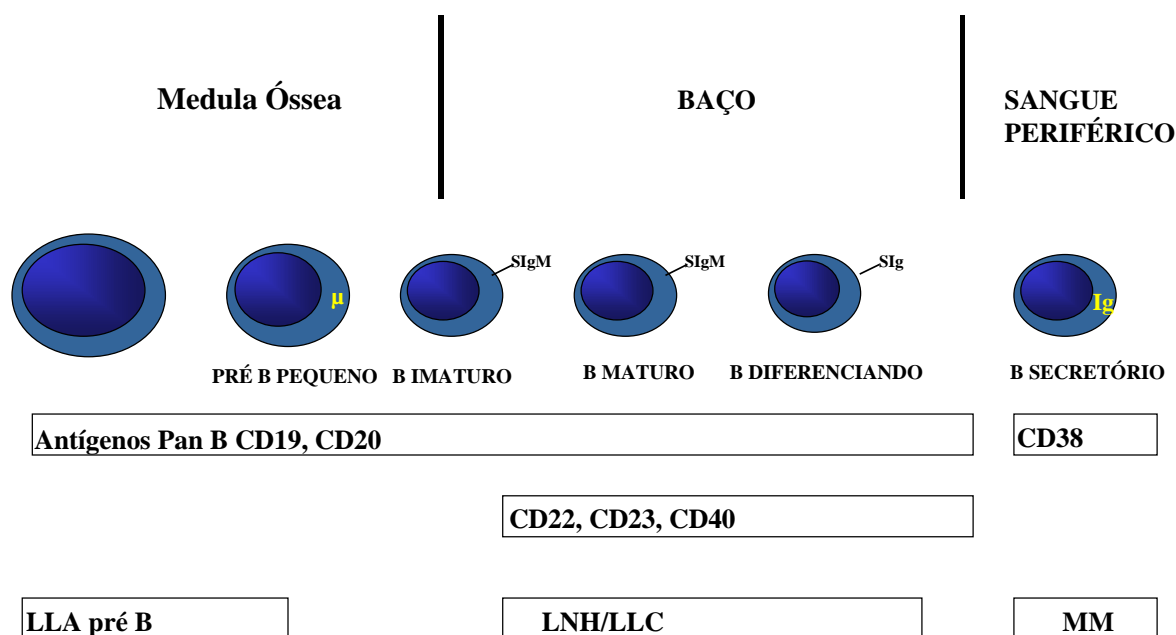


Figura 1. Histogênese da LLC

A caracterização imunofenotípica das células leucêmicas é de vital importância para o diagnóstico das desordens linfoproliferativas crônicas e vem sendo intensamente estudada devido à sua relação com prognóstico e sobrevida (JENNINGS, 1997). A imunofenotipagem característica da LLC-B típica associa cinco parâmetros principais, que são: a expressão de CD5 e CD23, a expressão fraca de imunoglobulina de superfície e de CD22 e ausência da expressão de FMC7. Este padrão típico de imunofenotipagem é associado com o padrão morfológico comum e encontrado em até 80% das LLC-B típicas (BENNETT, 1989; GARAND, 1996).

Tabela 1. Critérios diagnósticos para LLC:

Linfocitose absoluta no sangue periférico:
<ul style="list-style-type: none">• > 5 x 10⁹/litro (NCI/Working Group)
A maioria dos linfócitos devem ser pequenos e maduros
Subtipos Morfológicos(FAB)
<ul style="list-style-type: none">• LLC típica ou clássica: ≤ 10% linfócitos atípicos• LLC mixta/LPL: 11 a 54% prolinfócitos• LLC Atípica: proporção variada de linfócitos atípicos no sangue com <10% prolinfócitos
Características Imunofenotípicas:
<ul style="list-style-type: none">• Ig superfície monoclonal: +/-, CD5+, CD19+, CD20+, CD23+, FMC7-/+ , CD22-/+• Ausência de marcadores células T(exceto CD5)
Infiltração Medular:
<ul style="list-style-type: none">• > 30% linfócitos no aspirado medular ou padrão consistente à biópsia de medula óssea

Algumas complicações podem ocorrer durante a evolução da doença, como infecções, anemia e plaquetopenia. As infecções acometem 10 a 60% dos pacientes, geralmente nos estádios avançados e ocorrem devido à hipogamaglobulinemia (PRITSCH, 1998; DIGHIRO, 1991) e provavelmente como resultado de uma disfunção não clonal das células B CD5- ou secundária à diluição ou inibição destas células, levando a um estado de imunoincompetência (CALIGARIS-CAPPIO, 2001; ROZMAN, 1995; GALE, 1994). Outros mecanismos podem contribuir para a ocorrência de infecções de repetição, como a deficiência do sistema imune na produção de anticorpos específicos, a disfunção da imunidade celular e da opsonização de bactérias, além da neutropenia. A anemia e a

plaquetopenia podem ser consequência de um processo imunomediado, por diminuição na produção devido à infiltração medular ou por sequestro esplênico (STHOEGER, 1993). A neutropenia imune é rara na LLC-B e mais comum na LLC-T (DIGHIERO, 1991).

Os fenômenos auto-imunes são frequentemente observados na LLC-B e, na maioria das vezes, atingem as células hematopoiéticas. Eles podem se manifestar como um teste de Coombs Direto positivo (7,7% a 35%) (HAMBLIN, 1986), anemia hemolítica auto-imune (10 a 25%) e mais raramente, como doença da crioaglutinina, plaquetopenia imune (2%) ou aplasia pura da série vermelha. É descrito uma produção de autoanticorpos naturais, de baixa afinidade, polirreativos, monoclonais, da classe IgM pelas células B CD5+ da LLC e a produção de anticorpos policlonais, da classe IgG, de alta afinidade pelas células B CD5+ normais, a qual é responsável pelo desenvolvimento dos fenômenos auto-imunes associados a esta patologia. A interação das células leucêmicas B com as células T e as células B normais residuais parece desempenhar um papel neste processo. A proliferação e o acúmulo das células da LLC-B impede a produção normal de anticorpos, levando a um estado de imunoincompetência. Por este motivo, acredita-se que ocorra um distúrbio no mecanismo de antagonismo do clone auto-imune (CALIGARIS-CAPPIO, 2001). Descreve-se uma incapacidade dos linfócitos T na LLC-B de induzir a diferenciação plasmocitóide e a produção de imunoglobulinas, o que pode decorrer de um defeito primário da célula T ou secundário à proliferação do clone B maligno (LAURIA, 1983).

A desregulação imunológica observada nesta doença acomete principalmente o compartimento de células T. A porcentagem de células T no sangue periférico destes pacientes encontra-se diminuída devido ao acúmulo de células B anormais, porém o seu número absoluto é frequentemente aumentado (CALIGARIS-CAPPIO, 1999); além disso, observa-se uma depleção severa e de longa duração do compartimento linfocitário CD4+ e CD8+ (PRITSCH, 1998, GOOLSBY, 2000,). Estudos realizados a fim de avaliar funcionalmente as subpopulações das células T na LLC-B, observaram a ocorrência de um desbalanço entre as subpopulações de linfócitos com função auxiliadora (*helper*) e aqueles com função supressora e citotóxica, havendo um aumento da proporção destas últimas (MARTÍN, 1997; TÖTTERMAN, 1989, MATUTES, 1981), levando a um déficit na imunidade humoral e celular nestes pacientes (BARTIK, 1998). Reyes et al (1997)

verificaram uma associação clara entre os diferentes padrões fenotípicos e funcionais das subpopulações de células T da LLC-B e as características morfológicas das células leucêmicas. Encontramos um aumento na subpopulação de linfócitos CD4, CD8 e CD16 que expressam marcadores de ativação, diminuição relativa de linfócitos T CD4/CD45 (auxiliar-indutor) nos estadios precoces, aumento da população CD8/CD11b (supressor-efetor) e do número absoluto de células NK e NK DR+. Funcionalmente, as células NK encontram-se comprometidas, porém a capacidade destas células pode ser resgatada através do uso de interferon ou IL-2 recombinante (TÖTTERMAN, 1989). Isto pode refletir o mecanismo de resposta imunológica antitumoral, o qual ocorre entre as células T e as células da LLC-B, semelhante à estimulação antigênica crônica, ocasionando um acúmulo de células CD4 de memória, que ocorre de maneira mais pronunciada nos estadios mais avançados da doença (TÖTTERMAN, 1989; DIANZANI, 1994; DIGHIRO, 1991; KAY, 1979).

É descrito também uma alteração na produção de citocinas por esta população de células T oligoclonal e uma resposta secretória reduzida na cultura mixta com linfócitos autólogos e alogeneicos, sendo esta maior nos casos de doença progressiva. Os pacientes com doença avançada apresentam contagens maiores de célula T HLA-DR+ e menores de células T CD45RA+ e CD8+CD11b+ que os pacientes com doença em estadio inicial, o que pode sugerir uma resposta imune antitumor (DIANZANI, 1994).

O curso da doença também é variável. Naqueles pacientes com doença estável, a morbidade é pouco significativa e a expectativa de vida é semelhante à da população normal da mesma idade e sexo. A sobrevida média dos pacientes encontra-se em torno de 10 anos, atualmente. Entretanto, os pacientes que apresentam doença agressiva ou concomitância de complicações auto-imunes, apresentam morbidade significativa, com uma sobrevida média de 2 a 3 anos (ZWIEBEL, 1998). Nos pacientes que sofrem transformação para linfoma de grande células (Síndrome de Richter), a sobrevida é ainda menor, inferior a um ano (ROZMAN, 1995; DIGHIRO, 1991). É descrito uma maior incidência de neoplasias não hematológicas nos pacientes portadores de LLC, como os tumores epiteliais naqueles que fizeram uso crônico de clorambucil e também relatados tumores de pele, pulmão e trato gastrointestinal (DIGHIRO, 1991, HANSEN, 1973).

Alguns fatores são, sabidamente, relacionados com a sobrevida nestes pacientes, como o estadió clínico (RAI, 1975; BINET, 1981; BINET, 1981), o padrão histológico da infiltração da medula óssea (ROZMAN, 1984; PANGALIS, 1987), o número de linfócitos circulantes (BACCARANI, 1982), o tempo de duplicação de linfócitos (TDL) (MONTSERRAT, 1986) e a presença de anormalidades citogenéticas (MATUTES, 1996; JULIUSSON, 1990). Estudos recentes destacam como importantes para o prognóstico a idade, o sexo, o extensão do envolvimento ganglionar e da esplenomegalia, a anemia e a plaquetopenia (DIGHIERO, 1991), a presença de sintomas B, a morfologia dos linfócitos (GHANI, 1986; PETERSON, 1980; VALLESPI, 1991), a concentração sérica de desidrogenase láctica (LDH), a captação de timidina quinase, o nível sérico de $\beta 2$ microglobulina, o nível de CD23 solúvel (REINISCHI, 1994) e CD25 e CD38 (ZUPO, 1996; IBRAHIM, 2001), além da presença de mutações no gene p53 (HALLEK, 1997; MELO, 1987; CORDONE, 1998; FRENCH COOPERATIVE GROUP ON CLL, 1990).

Algumas alterações citogenéticas são descritas na LLC-B, podendo acometer 50 a 80% dos casos (BULLRICH, 1999). Elas ocorrem de maneira não randômica, sendo as mais comuns a trissomia do cromossomo 12 e as anormalidades dos cromossomos 13 e 11 e geralmente associadas com prognóstico ruim (ROZMAN, 1995). A alteração citogenética mais comumente encontrada é a deleção do braço longo do cromossomo 13 na banda q14, presente em 25% dos casos de LLC. Ela afeta, neste locus, um gene supressor de tumor, o qual parece codificar uma proteína pró-apoptótica, levando a um aumento da sobrevida destas células. A perda de um alelo deste gene, retinoblastoma 1 (RB1), é associada com esta deleção, descrita em 80 a 90% dos casos e em 38-46% de pacientes com citogenética normal. A deleção do cromossomo 13q14 parece representar um evento clonal precoce na LLC, pois estudando-se marcadores moleculares para a esta região, verificou-se a presença de uma região mínima de deleção (MRD) em todos os casos com a deleção 13q14. Os pacientes com esta anormalidade evoluem de maneira estável, apresentando sobrevida semelhante à população da mesma idade e sexo e cursam com mutações somáticas do gene da imunoglobulina.

Outra alteração citogenética comum, presente em 20% dos casos, é a trissomia do cromossomo 12, associada com morfologia atípica, progressão da doença e curso clínico agressivo. Geralmente estes pacientes não apresentam mutações no gene da cadeia pesada de imunoglobulina (MOULD, 1996; FINN, 1996, CALIGARIS-CAPPIO, 1999). Outras translocações podem ser encontradas nos casos de LLC-B, como a deleção nas bandas 11q22-q23, presente em 13-18% dos casos e associada ao gene da ataxia-telangiectasia (ATM). Esta deleção é descrita em pacientes com acometimento ganglionar e com curso clínico agressivo e apresenta relação direta com a progressão da doença em casos de leucemias de origem T e pesquisas recentes mostram esta mesma relação em casos de LLC-B.

As alterações no gene supressor de tumor, p53, são descritas em 10 a 15% dos casos de LLC e ocorrem na posição p13.3 do cromossomo 17. O gene p53 induz à permanência no ciclo celular das células com dano do DNA, permitindo seu reparo ou levando à apoptose as células lesadas irreversivelmente. Portanto, a presença de mutações neste gene e a expressão da proteína p53 mutante é associada com morfologia atípica dos linfócitos, doença mais agressiva, menor intervalo livre de tratamento e resistência ao tratamento (CORDONE, 1998, ZWIEBEL, 1998; MICHALIDES, 1999).

O acúmulo de clones de células B malignas em pacientes com LLC-B ocorre primariamente devido às alterações na regulação da apoptose e não devido ao aumento na proliferação celular. Reconhece-se também o envolvimento da expressão dos genes inibidores da apoptose neste processo, como a superexpressão do bcl-2, levando a um aumento na sobrevivência das células da LLC (GALE, 1994; HANADA, 1993), mesmo na ausência de rearranjos do locus deste gene. O mesmo não ocorre com as células B CD5+ normais, que expressam pequenas quantidades ou traços do bcl-2 (CALIGARIS-CAPPIO, 1996). Isto pode ser a razão das células B não progredirem no ciclo celular, por incapacidade de serem ativadas por sinais que ativam as células B normais ou por incapacidade de bloquearem a expressão do bcl-2. A superexpressão do bcl-2 e a alta relação bcl-2/bax nas células *in vivo* foram observadas nos pacientes com LLC e se correlacionou com a diminuição da apoptose em cultura e com resistência clínica aos agentes quimioterápicos (ROJAS, 1996; CALIGARIS-CAPPIO, 1996; PANAYIOTIDIS, 1993; RICCIARDI, 2001;

HERAULT, 1999; ROBERTSON, 1993; AVIRAM, 2000). As translocações envolvendo o gene *bcl-2* no cromossomo 18 e o locus do gene da imunoglobulina no cromossomo 2 (cadeia kappa), 14 (cadeia pesada) e 22 (cadeia lambda) ocorrem em somente 1 a 4% dos casos de LLC, embora mais de 85% dos casos de LLC-B apresentam superexpressão do gene *bcl-2*. Este gene codifica um potente supressor da apoptose, o que leva à produção de níveis elevados da proteína anti-apoptótica *bcl-2* (REED, 1998; MATUTES, 1996).

Outros genes influenciam a apoptose nas células da LLC-B, como o Fas e o gene *p27*. O Fas é um antígeno de membrana que induz a apoptose após a sua ligação com o seu receptor FasL. A sua expressão nesta doença encontra-se reduzida, sugerindo uma resistência à apoptose nestas células (ZWIEBEL, 1998; OSCIER, 1999). O gene *p27* também está envolvido na regulação do ciclo celular e, conseqüentemente, com a sobrevida em alguns tumores. Na LLC-B parece estar relacionado com uma maior sobrevida, sendo descrito uma maior porcentagem e um número maior de células Ki67 positivas com a progressão da doença (CORDONE, 1998), contrariamente ao que ocorre com o tumor de mama e câncer colorretal (VRHOVAC, 1998; LODA, 1997; PORTER, 1997; TAN, 1997).

Tanto fatores externos como defeitos genéticos das células neoplásicas podem influenciar esta capacidade de bloquear a apoptose. As células leucêmicas na LLC, em sua maioria, encontram-se na fase G0 do ciclo celular (CALLIGARIS-CAPPIO, 1999; AWWAD, 1967), com algumas raras células mostrando evidências de proliferação. Porém, estas células em repouso metabólico expressam marcadores celulares de ativação e são irresponsivas a estímulos externos que favorecem a progressão no ciclo celular das células B normais (CALIGARIS-CAPPIO, 2000). Além disso, expressam RNAm para várias citocinas, algumas das quais são secretadas. Quando mantidas em meio de cultura sem mitógenos, *in vitro*, elas morrem rapidamente por apoptose espontânea numa proporção variável, ao contrário do que ocorre *in vivo*. As células B clonais produzem e secretam IL-4, o que não ocorre com linfócitos T normais, mostrando o seu efeito modulador da apoptose nestas células (MU, 1997). Sabe-se que a adição de anticorpo anti-IL-4 e IL-4 recombinante nestas culturas, provoca um aumento da sobrevida destas células, provavelmente devido à inibição da apoptose (KAY, 2001; PANAYIOTIDIS, 1993). O efeito da IL-4 se dá através da ativação de uma tirosina fosfatase específica, sem induzir alterações morfológicas nas células (McCONKEY, 1991; MIRE-SLUIJS, 1991).

Outras citocinas parecem estar envolvidas no crescimento e diferenciação destas células leucêmicas, conferindo-lhes uma maior sobrevida, como o TNF- α , o interferon γ , a IL-1, o receptor da IL-2, a IL-6, IL-10 e o fator de crescimento de fibroblasto (FGF). O TNF- α produzido e liberado pelas células leucêmicas, regula a proliferação do clone neoplásico. A presença de elevados níveis desta citocina se correlaciona positivamente com o estadio da doença, com os maiores níveis encontrados nos pacientes com doença avançada (ADAMI, 1994), porém é descrito também uma relação inversa entre seu nível sérico e o estadio da doença, sugerindo um papel regulatório na progressão da doença (FOA, 1990). O interferon- γ inibe a apoptose das células clonais, mostrando uma relação direta entre o grau da inibição e o estágio clínico (ROJAS, 1996). A IL-1 β é produzida pelas células clonais e protege estas células da apoptose espontânea e induzida por corticóide e níveis elevados desta proteína estão associados com doença avançada. O receptor da IL-2 é expresso também por estas células e dosagens séricas elevadas estão relacionadas também com doença avançada (TSILIVAKOS, 1994). A IL-6 é um indutor da proliferação nas células da LLC, tendo sua ação mediada pelo retardo na supressão do Bcl-2. A dosagem sérica de seu receptor apresenta correlação positiva com o TTM e com o estadio da doença (MORENO, 2001). A IL-10 é uma citocina com ação inibitória na síntese de algumas citocinas, como o IFN- γ , a IL-1, a IL-6 e o TNF- α , exercendo um efeito indutor da apoptose. As células leucêmicas expressam RNAm e o receptor da IL-10 e elevados níveis desta proteína estão associados com doença estável, destacando seu papel no curso da doença (SJOBERG, 1996; CASTEJON, 1999). O FGF é uma citocina reguladora da angiogênese e que se comporta como uma citocina hematopoética. Maiores níveis desta proteína são encontradas nos estádios intermediários e avançados e nos casos refratários à fludarabina, indicando seu efeito na resistência à apoptose (MENZEL, 1996).

O tratamento da leucemia linfóide crônica está indicado para aqueles pacientes com doença avançada, com sintomas B, sinal de insuficiência medular, na presença de grandes massas ou apresentando fenômenos auto-imunes refratários à corticoterapia. A introdução da quimioterapia é recomendada após um período de observação da evolução da doença, pois alguns pacientes podem não apresentar critérios de tratamento, porém já com sinais de atividade de doença. Estes parâmetros podem ser avaliados pelo tempo de

duplicação de linfócitos abaixo de 12 meses, padrão das AgNORs (clusters), elevação das dosagens séricas de desidrogenase láctica e ácido úrico, padrão difuso de infiltração medular, presença de anormalidades citogenéticas, entre outras. O tratamento de escolha consiste no uso contínuo (0,3 mg/kg) ou intermitente (0,4 a 0,8 mg/kg a cada 2-4 semanas) de clorambucil, um derivado aromático da mostarda nitrogenada. Ambos os esquemas produzem resposta em 40-60% dos casos. A prednisona, utilizada na dose de 30 a 60 mg/m²/dia, é empregada, como monoterapia, nos casos de citopenias imunes secundárias à doença. Ela é utilizada em associação com o clorambucil, com taxas de resposta semelhante ao clorambucil utilizado isoladamente. A poliquimioterapia é utilizada naqueles pacientes refratários ao clorambucil ou com doença em progressão. O esquemas mais utilizados consistem na associação de ciclofosfamida, vincristina e prednisona, associado ou não à doxorrubicina (COP e CHOP, respectivamente), com taxas de resposta superiores para o segundo esquema, porém sem melhora na sobrevida quando comparados os dois esquemas (O'BRIEN, 1995; MONTSERRAT, 1997). Os análogos dos nucleosídeos têm mostrado boa resposta nos pacientes não responsivos ao clorambucil, com respostas superiores em relação à sobrevida global e duração da resposta ao tratamento, quando comparados com o clorambucil isolado ou com a poliquimioterapia. A fludarabina, bem como a cladribina e a pentostatina têm se mostrado eficazes, porém dentre estas, a mais conhecida e utilizada na LLC é a fludarabina (MONTSERRAT, 1993; RAI, 1999). Novas estratégias vêm sendo testadas , como a utilização do anticorpo monoclonal anti-CD20, rituximab e o anticorpo anti CD-52, o Campath-1H , mostrando resultados em torno de 33% nos casos refratários à fludarabina (KEATING,1999). Nos pacientes jovens, o transplante de medula óssea autólogo com *purging* ou alogeneico ainda podem ser incluídos no arsenal terapêutico, mostrando boas respostas, porém com morbidade elevada.

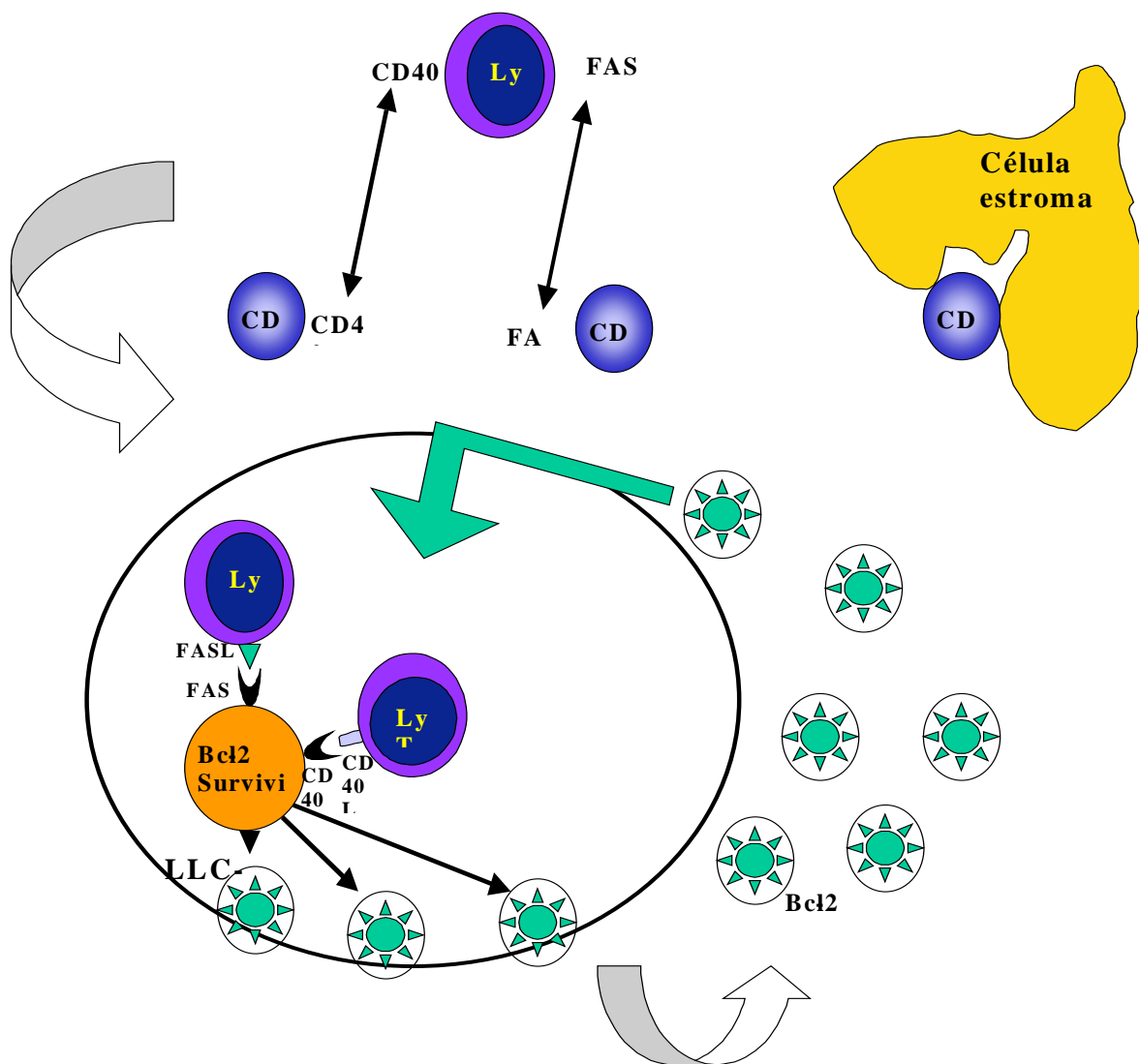


Figura 2. Esquema mostrando a interferência do microambiente no processo de apoptose na LLC-B.

APOPTOSE:

A apoptose é um modo distinto de morte celular responsável pela deleção de células isoladas em tecidos normais e em alguns contextos patológicos específicos. Inicialmente citada por Walther Fleming (1885) que, estudando folículos ovarianos em mamíferos, descreveu que os folículos em involução se destacavam entre as células normais, formando semiluas de cromatina picnótica, processo que fora denominado cromatólise. Em 1914, Ludwig Graper, anátomo-patologista alemão, publicou um artigo sobre a cromatólise, sendo esta considerada um processo de ocorrência natural, complemento da mitose e observada na maioria dos tecidos vivos. Somente em 1950, com Glucksmann, é que surge a descrição do processo apoptótico, porém só reconhecido em tecidos embrionários e que se consolidou em 1960, com os estudos de densidade óptica, difração de luz e autofluorescência de tecidos mortos e em processo de morte celular, que foi comparada a morte celular isquêmica com necrose. Em 1971, Kerr induziu atrofia hepática em camundongos e descreveu um *descolamento* das células, num processo chamado inicialmente de necrose por encolhimento e posteriormente, apoptose (KANE, 1995; MAJNO, 1995).

A apoptose é um processo fisiológico e regulado, necessitando de alterações para que seja desencadeado e finalizado, ou seja, envolve o reconhecimento de sinalização específica e intervenção de sistemas reguladores e executores. Ao nível celular, a apoptose é caracterizada por compactação e marginação da cromatina nuclear, condensação nuclear e posteriormente do citoplasma, com a formação dos corpos apoptóticos contendo organelas íntegras que serão fagocitadas pelas células ao redor e degradadas no interior dos lisossomos. Este processo pode ser iniciado por mecanismos internos ou por agentes extracelulares, como hormônios, citocinas, células suicidas e uma variedade de agentes químicos, físicos e vírus. Ao nível bioquímico, o que ocorre inicialmente, independentemente do estímulo desencadeador, é a clivagem do DNA de dupla hélice nas regiões de ligação dos nucleossomos, sendo o restante do DNA protegido da digestão. Com isso, há a produção de múltiplas cadeias de 180-200 pares de bases (que correspondem ao comprimento de um nucleossoma simples), que são detectados pela eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio e analisados sob luz ultravioleta (KERR, 1994; ALLEN,

1993). Este processo de clivagem é feito por uma endonuclease endógena e estreitamente controlado por vários genes, como o bcl-2 e os genes da família de ativadores da endonuclease (ICE) (Figura 3) (McCONKEY, 1990; VAUX, 1994; ALLEN, 1997).

Pesquisas recentes estudando apoptose em portadores de LLC mostraram que esta raramente é observada em amostras de sangue de pacientes logo após a coleta. Porém após 24 a 72 horas de cultura, ela pode variar de 3 a 65% (BINET, 1996). Isto não ocorre em células B e T de indivíduos normais. Ricciardi et al (2001) estudando a susceptibilidade à apoptose das células leucêmicas nas diferentes fases da doença, verificaram que a apoptose avaliada após 24 horas em cultura, era maior em pacientes em fase estável. Estudos têm sido desenvolvidos no sentido de correlacionar a apoptose nestes pacientes com o estágio e evolução clínica da doença, resposta ao tratamento e com a expressão de determinados genes. Estudando-se as proteínas reguladoras da apoptose, principalmente as proteínas da família bcl-2 (bcl-x, Mcl-1, Bax, Bak, BAD, a proteína de ligação do bcl-2 BAG-1) e a protease de morte celular (Caspase-3) observou-se que o padrão de expressão dessas proteínas está relacionado com a sobrevida global (ROBERTSON, 1996; DiGiUSEPPE, 1997) e a relação bcl-2/ bax com resposta à terapêutica (PEPPER, 1999). Não foi mostrado correlação da expressão do bcl-2 com o estágio da doença (ROBERTSON, 1996). Essa expressão, porém, foi maior nos casos de doença refratária (BINET, 1996; AGUILAR-SANTELISES, 1996; SHINICHI, 1998). Estudos mostram que o número de anormalidades citogenéticas associa-se ao estágio da doença, sendo estas maiores nos pacientes com doença avançada e com o tempo de evolução da doença prolongado (LAZARIDOU, 2000). O aumento dos níveis da proteína bcl-2 ocorre precocemente no curso da doença, enquanto a expressão da proteína c-myc e p53 tipo selvagem mais tardiamente, porém sem correlação com o grau de apoptose espontânea e com o nível inicial destas proteínas. Em pacientes virgens de tratamento, verificou-se que altos níveis de proteínas anti-apoptóticas, como Mcl-1 e BAG-1, podem estar relacionados com baixa quimiossensibilidade in vivo. Estudando os pacientes tratados, verificou-se uma maior relação de bcl-2/bax nestes pacientes e nos não tratados quando comparados com os controles normais, sendo estas alterações mais pronunciadas nos pacientes resistentes à quimioterapia convencional (PEPPER, 1996; PEPPER, 1997). Com relação às drogas, verificou-se que alguns quimioterápicos, como 2-CDA, Fludarabina, Clorambucil,

Mitoxantrone, Etoposide, Vincristina e Vimblastina, bem como, corticosteróides e radioterapia têm seu efeito mediado pela apoptose (CONSOLI, 1998).

Uma outra via envolvida da apoptose espontânea nos portadores de LLC é a via do AMP cíclico, cujo exemplo é a teofilina, que inibe a fosfodiesterase intracelular, inibindo a conversão do AMP cíclico em 5' AMP, provocando o seu acúmulo no meio intracelular. A incubação de células de pacientes com LLC-B com teofilina produz um aumento da apoptose, dose-dependente, da ordem de 4 a 5 vezes o nível basal (MENTZ, 1995).

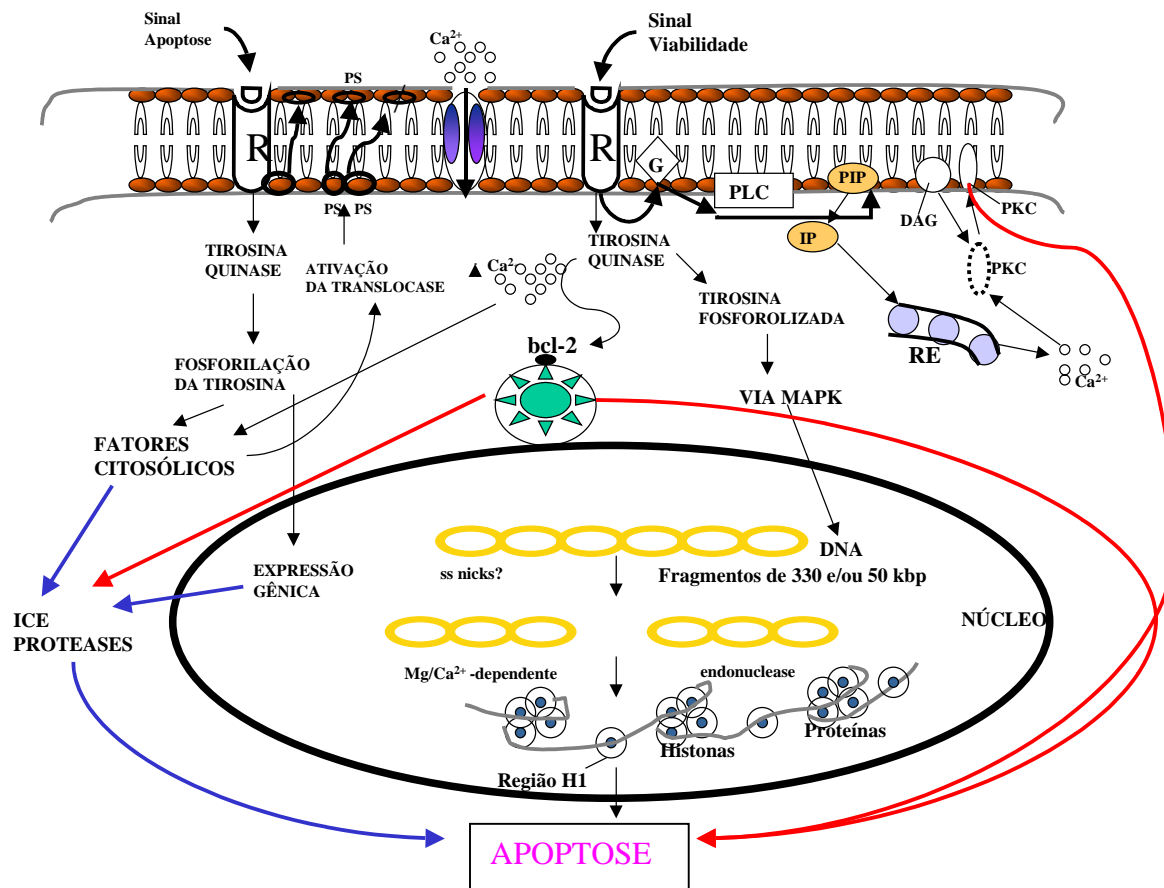


Figura 3. Esquema mostrando as diferentes vias envolvidas na apoptose.

Como já é sabido, as células hematopoiéticas normais possuem uma disposição assimétrica dos fosfolípidos de membrana, com a fosfatidilcolina e a esfingomielina localizando-se preferencialmente na sua porção externa e a fosfatidiletanolamida e a fosfatidilserina na sua porção interna. Com a evolução do processo apoptótico, ocorre a perda dessa assimetria e a exposição da fosfatidilserina na sua superfície externa, seguida da quebra das alças de DNA (VERMES, 1995), porém sem a ruptura da integridade da membrana celular (KOOPMAN, 1994; MADNO, 1995; MERCHANT, 2001). A quebra em fragmentos de 30 a 50 kpb é um evento inicial na apoptose (BROWN, 1993) e ocorre pela ação de uma endonuclease que quebra o DNA. Já na etapa final do processo, ocorre uma degradação incompleta do DNA nas regiões internucleossomais, produzindo fragmentos de, aproximadamente, 200pb que aparecem no gel de eletroforese como uma banda (ORMEROD, 1998). Devido à afinidade da Anexina V pelos fosfolípidos carregados negativamente, como a fosfatidilserina, utilizou-se esta proteína para marcar o início do processo apoptótico (van ENGELAND, 1998). As células em apoptose se tornam Anexina V positivas após o início da condensação da cromatina e antes das células se tornarem permeáveis ao iodeto de propídeo (PI), um corante não vital que marca a ruptura da membrana citoplasmática. As células apoptóticas excluem os corantes não vitais utilizados para a avaliação da viabilidade celular, como o PI e o azul de Trypan, enquanto as células necróticas não o fazem. Nestas células, o PI vai levar à formação de uma fluorescência vermelha do DNA e ausência da mesma nas células com membrana citoplasmática intacta. Então, teremos três configurações diferentes na citometria com análise bivariada Anexina V-FITC/PI: as células viáveis que são negativas para Anexina V e para o PI; as células apoptóticas, que são positivas para a Anexina V e negativas para o PI e as células necróticas, que serão positivas tanto para a Anexina V quanto para o PI (KOOPMAN, 1994; HAMEL, 1996; VERMES, 1997; BERTHO, 2000). Devido ao fato das células apoptóticas excluírem o iodeto de propídeo, como fazem as células viáveis, é importante o estudo do fenótipo celular, realizado com uma combinação de anticorpos de superfície marcados com FITC e PE (SHERWOOD, 1995; TELFORD, 1992). Outros métodos são utilizados para a avaliação da apoptose e incluem o DAPI, a acridina orange, o corante Hoechst 33342 (CHIU, 1996; ORMEROD, 1993; SCHMID, 1994; PEPPER, 1998) e a Apostafina (FERLINI, 1997). As células apoptóticas se diferenciam das células necróticas

pois as primeiras mostram uma redução na intensidade da coloração com fluorocromos específicos para DNA, enquanto as últimas não apresentam esta característica.

Para a avaliação da apoptose em nosso trabalho, foi utilizada a Anexina V em linfócitos após 48 horas de cultura, com a exclusão das células mononucleares aderentes. A ligação da Anexina V foi avaliada através de citometria de fluxo bivariada, utilizando na coloração das células, a Anexina V marcada com FITC e o corante de exclusão, iodeto de propídeo marcado com PE. Com isso, conseguimos distinguir três diferentes populações celulares: as células viáveis, as células apoptóticas e as células necróticas (VERMES, 1995), baseado na determinação da translocação da fosfatidilserina da superfície interna para a superfície externa da membrana plasmática, corada pela Anexina V. Este é um método quantitativo e sensível para a detecção das fases iniciais da apoptose (MERCHANT, 2001).

REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLEÓLO (AgNORs):

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) estão localizadas na constricção secundária das metáfases dos cromossomos acrocêntricos humanos 13, 14, 15, 21 e 22. Durante a interfase, estas se localizam nos centros fibrilares ao redor dos componentes fibrilares densos do nucléolo. As alças de DNA ribossômico são responsáveis pela transcrição do RNA ribossômico, onde as proteínas NORs se localizam (LORAND-METZE, 1998; CANET, 2001). Estas proteínas podem ser visualizadas usando uma técnica de coloração com a prata, chamada AgNOR. A técnica das AgNOR é um marcador de proliferação celular utilizado em patologia, sendo seu tamanho e seu número relacionado com a atividade proliferativa celular (CROCKER, 1988; TRÈRE, 1989; EVANS, 1991; GROTO, 1991). É também utilizado para diferenciar células benignas de células malignas (CHERN, 1997; DERENZINI, 1989) e apresenta relação com o prognóstico de alguns tumores (SMITH, 1988; PITCH, 1994; PITCH, 1998).

Os linfócitos normais em cultura que apresentam um ou mais núcleos compactos correspondem às células em repouso metabólico (G0) e ao entrar no ciclo proliferativo após estímulo passam a apresentar clusters de AgNOR (CROCKER, 1989; LEEK, 1991, WACHTLER, 1982). Paralelamente, os linfócitos da LLC com 1 ou 2

nucléolos compactos representam as células em G0 e aqueles com 1 cluster de AgNOR representam a fração proliferativa circulante e se correlacionam com o tempo de duplicação dos linfócitos, TTM, idade e nível de hemoglobina (LORAND-METZE, 1996). Estudos sobre o ciclo celular de células em proliferação observaram que o tamanho do AgNOR é inversamente proporcional ao tempo de duplicação celular e que o produto entre o tamanho do AgNOR e a duração do ciclo celular é uma constante, qualquer que seja a temperatura, ou seja, quanto maior a velocidade de proliferação, maior a quantidade de proteínas das regiões organizadoras de nucléolos durante a intérfase e menor a duração do ciclo celular (CANET, 2001; LORAND-METZE, 1998; DERENZINI, 1998). O número de pontos prata positivos tem relação com a fração de proliferação (% células em fase S) (LORAND-METZE, 1998) e com a imunorreatividade do Ki-67 (CROCKER, 1988).

Em nosso trabalho, utilizamos a técnica de AgNOR para o estudo da proliferação na LLC, pois a fração proliferativa nesta doença é muito baixa e esta técnica permite detectar um pequeno número de células em ciclo celular. Estudos anteriores permitiram demonstrar que a fração proliferativa circulante na LLC (% de células com cluster de AgNOR) tem relação com o índice de massa tumoral (TTM) e com o tempo de duplicação linfocitária (TDL) (LORAND-METZE, 1996), sendo um parâmetro capaz de prever o tempo livre de tratamento (METZE, 2000). Em relação ao comportamento da doença, nos casos estáveis, o número de células com um cluster de AgNOR e o TTM se mantiveram inalterados, enquanto que nos casos em progressão da doença, o número de células com um nucléolo compacto conseguiu prever a resposta à quimioterapia em 43% dos casos, ressaltando a importância da análise do AgNOR na LLC (METZE, 1999).

Portanto, buscamos avaliar a apoptose espontânea nos pacientes estáveis e com doença avançada, através da técnica da Anexina V, correlacionando-a com os parâmetros de proliferação, determinados pela porcentagem de células com um cluster de AgNORs e o TTM e com os parâmetros clínicos e laboratoriais, a fim de destacar a influência destes na evolução e prognóstico da doença.



OBJETIVOS

- Analisar a apoptose espontânea em cultura de linfócitos periféricos de pacientes com diagnóstico de LLC, após 48 horas de cultura com meio enriquecido.
- Estudar a atividade proliferativa dos linfócitos circulantes nos pacientes portadores de LLC.
- Verificar a interrelação entre a apoptose in vitro e os parâmetros clínicos, de estadiamento e de progressão da doença.
- Verificar a relação entre proliferação e apoptose na LLC.
- Verificar a relação entre a apoptose e os parâmetros prognósticos da LLC.



***PACIENTES E
MÉTODOS***

- **PACIENTES:**

Foram selecionados para o estudo, pacientes portadores de LLC, tratados ou não e acompanhados no serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, no período de janeiro de 1998 a janeiro de 2001. O diagnóstico foi baseado nos achados de linfocitose monoclonal no sangue periférico (linfócitos $>5 \times 10^9/l$), linfonodomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e infiltração linfóide da medula óssea superior a 30%, com o estudo de imunofenotipagem confirmando a monoclonalidade B.

1. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os dados relativos à identificação, história e os dados laboratoriais e do exame físico foram obtidos a partir do prontuário dos pacientes. Foram usados como dados de identificação o nome, a idade, o sexo e o número do prontuário. Entre os dados do exame físico foram observados a presença e a extensão da linfonodomegalia e das visceromegalias, que foram utilizadas para o estadiamento clínico. O estadiamento clínico foi avaliado pelo sistema de RAI (Tabela 2) e BINET (Tabela 3). A massa tumoral foi calculada pelo índice TTM (Tabela 4).

2. AVALIAÇÃO LABORATORIAL

A avaliação laboratorial incluiu hemograma completo, eletroforese de proteínas, dosagem de $\beta 2$ microglobulina e desidrogenase láctica séricas. A análise do sangue periférico e aspirado de medula óssea foi feita através de esfregaços corados pelo método de Leishman e a avaliação morfológica por exame de microscopia óptica. O painel de anticorpos monoclonais para a imunofenotipagem, feito com duas cores no equipamento FACScalibur (software Cell Quest) incluiu: CD19/CD10, CD20/CD5, CD23, cadeias leves κ e λ , CD3/CD4 e CD3/CD8 (reagentes Becton Dickinson e Dako).

Tabela 2. Estadiamento segundo RAI para leucemia linfóide crônica: principais achados clínicos e laboratoriais e sobrevida esperada em anos.

	Estadio	Achados Clínicos Laboratoriais	Sobrevida (anos)
Baixo Risco	0	Linfocitose	> 15
Risco Intermediário	I	Linfocitose	9
		Linfonodomegalia	
	II	Linfocitose	5
		Espleno e/ou hepatomegalia	
Alto Risco	III	Linfocitose	2
		Anemia (Hb<11g/dl)	
	IV	Linfocitose	2
		Plaquetopenia ($<10 \times 10^9/l$)	

Tabela 3. Estadiamento segundo BINET para leucemia linfóide crônica: principais achados clínicos e laboratoriais e sobrevida esperada em anos.

Estadio	Achados Clínicos Laboratoriais	Sobrevida (anos)
A	Ausência de anemia e/ou Plaquetopenia Linfonodomegalia em menos de 3 cadeias	12
B	Ausencia de anemia e/ou Plaquetopenia Linfonodomegalia em 3 ou mais cadeias	5
C	Anemia(Hb<10g/dl) e/ou Plaquetopenia (<10X10 ⁹ /l)	2

- **SUBGRUPO A':** Hemoglobina > 12g/dl
Linfocitose periférica < 30 x 10⁹/l
Envolvimento ganglionar em menos de 2 áreas
Acometimento da medula óssea < 80%
- **SUBGRUPO A'':** Hemoglobina ≤ 12g/dl
Linfocitose periférica ≥ 30 x 10⁹/l
Envolvimento ganglionar em 2 ou mais áreas
Acometimento da medula óssea ≥ 80%

(British Journal Haematology.1990(76): 45-57; Seminars Oncol.1998(25)1:42-59)

Tabela 4. Índice de massa tumoral (TTM):

TTM: $\sqrt{L + \text{linf} + B}$

L: número de linfócitos no sangue periférico/1000

Linf: diâmetro do maior linfonodo em cm

B: tamanho do baço em cm abaixo do rebordo costal E

Foram avaliados durante o acompanhamento dos pacientes, a existência de linfonodomegalia, hepato e/ou esplenomegalia e os índices hematimétricos, para o acompanhamento da evolução da doença. Nos pacientes não tratados, estes dados foram utilizados para calcular o tempo necessário para atingir os critérios de tratamento e nos pacientes tratados, para a avaliação da resposta ao tratamento. Os critérios considerados importantes para a decisão de se iniciar o tratamento seguiram as recomendações do protocolo do serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Unicamp (Tabela 6).

Tabela 5. Índice prognóstico

ÍNDICE PROGNÓSTICO = TTM + % CÉLULAS COM CLUSTERS DE AgNORs

Tabela 6. Critérios utilizados para o início da terapia, segundo o protocolo do serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Unicamp.

CRITÉRIOS :
<ul style="list-style-type: none">▪ UM DOS SEGUINTE SINTOMAS RELACIONADOS À DOENÇA DEVE ESTAR PRESENTE:<ul style="list-style-type: none">– PERDA DE PESO $\geq 10\%$ PESO NOS ÚLTIMOS 6 MESES– FADIGA EXTREMA OU PERFORMANCE STATUS RUIM– FEBRE POR MAIS DE 2 SEMANAS, NA AUSÊNCIA DE INFECÇÃO– SUDORESE NOTURNA, NA AUSÊNCIA DE INFECÇÃO▪ INSUFICIÊNCIA MEDULAR PROGRESSIVA: desenvolvimento ou piora da anemia e/ou plaquetopenia▪ ANEMIA E/OU PLAQUETOPENIA AUTOIMUNE POUCO RESPONSIVA À CORTICOTERAPIA▪ ESPLENOMEGALIA PROGRESSIVA (> 6 cm RCE)▪ LINFONODOMEGALIA PROGRESSIVA OU PRESENÇA DE MASSA > 10 cm▪ LINFOCITOSE PROGRESSIVA COM AUMENTO $> 50\%$ NUM PERÍODO DE 2 MESES OU TDL < 6 MESES

MATERIAL CLÍNICO:

Foram colhidas amostras de sangue total dos pacientes com LLC-B através de venopunção em tubos Vacutainer de 10ml (Vacuette) contendo heparina sódica para a cultura de linfócitos, tubo de 4ml contendo EDTA (Vacuette) para hemograma e imunofenotipagem e tubo seco de 8 ml (Vacuette) para exames bioquímicos, como desidrogenase láctica e eletroforese de proteínas séricas. Todas as amostras foram manipuladas imediatamente após a coleta. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado para a participação no estudo.

PREPARAÇÃO E CULTURA DOS LINFÓCITOS:

As amostras de sangue total dos pacientes foram diluídas com 10 ml de RPMI (CultLab) e, então, adicionadas a 4 ml de Ficoll-Hypaque. As células mononucleares do sangue periférico foram coletadas e separadas por centrifugação e gradiente de densidade. Após a centrifugação a 1500 rpm por 30 minutos a 25°C, utilizando a citocentrífuga Beckman modelo GS-6R, a interface da camada contendo as células mononucleares foi removida, lavada duas vezes com meio contendo soro fetal bovino a 10% com gentamicina solução- reagente 125µg/100ml (GibcoBRL), por 10 minutos, em temperatura de 10° a 20°C. O pellet foi, então, ressuscitado a uma concentração de 2×10^7 células/ml, cuja contagem foi feita no aparelho CellDyn 1700 (Abott). Após isso, a cultura dos linfócitos foi lançada em garrafas próprias de 10 ml contendo 2×10^7 células/ml, 1000µl de PBS e o restante do volume com meio de cultura para completar o volume final de 10 ml. Os linfócitos foram separados das células mononucleares aderentes através da incubação da suspensão de células por 1 hora a 37°C em um frasco de plástico contendo poliestireno, onde elas ficaram aderidas. Os linfócitos não aderentes no sobrenadante foram, então, coletados e ressuscitados em 5000µl de meio. A suspensão de células foi passada no aparelho CellDyn 1700, a fim de se obter 2×10^7 células para 10 ml de meio.

Os linfócitos ($\pm 2 \times 10^7$ /ml) foram semeados em meio de cultura (CultLab) suplementado com soro fetal bovino a 10% aquecido a 56°C por 30 minutos, 100 µl/ml de estreptomicina, 100 UI/ml de penicilina e 2mM L-glutamina (CultLab). As células foram

mantidas num ambiente com atmosfera totalmente umidificada, com 95% de ar e 5% de CO₂ e retiradas após 48 horas de cultura. O conteúdo de cada garrafa de cultura foi, então, centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos, lavado duas vezes com PBS e centrifugado novamente a 1500 rpm por 5 minutos. A amostra final foi diluída em 1 ml do tampão do kit da Anexina V. A contagem final das células foi determinada pelo aparelho CellDyn 1700 e a viabilidade celular avaliada nos períodos pré e pós cultura através da exclusão pelo azul de Tripán.

VIABILIDADE CELULAR EM CÂMARA DE NEUBAUER:

A viabilidade celular foi avaliada nos períodos pré e pós cultura pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. Este corante, que penetra somente nas células onde há ruptura da membrana celular, é diluído em igual volume de PBS e a solução misturada à suspensão de linfócitos, numa proporção de 1:10 a 1:20, dependendo da concentração de células. A viabilidade celular foi obtida através da relação do número de células viáveis e das células totais das amostras avaliadas na câmara de Neubauer, sob microscopia óptica, em aumento de 20X .

MICROSCOPIA ÓPTICA:

Após a retirada da cultura, as células a serem avaliadas foram centrifugadas a 1500 rpm, usando a citocentrífuga Beckman GS-6R. As células foram fixadas com 100% metanol e coradas pelo método de Leishman e examinadas para a detecção de alterações nucleares compatíveis com a apoptose. Duzentas células foram avaliadas por esfregaço.

TESTE DA ANEXINA V:

A apoptose foi avaliada após 48 horas de cultura pela técnica da Anexina V. Esta se baseia no fato de que a fosfatidilserina é exposta na superfície de células lesadas irreversivelmente e que a Anexina V possui alta afinidade por esta proteína. Isto ocorre

tanto nos estágios iniciais da apoptose quanto nas células em necrose. A diferença entre estes dois processos é que na apoptose, a membrana celular se mantém intacta, enquanto na necrose ocorre a perda da integridade da membrana celular e esta se torna permeável, tornando possível a reação entre o iodeto de propídeo (PI) e o DNA nuclear. Através do uso do citômetro de fluxo com análise bivariada, foi possível avaliar simultaneamente as diferentes populações de células: aquelas coradas com Anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), que mostra fluorescência verde e aquelas coradas com iodeto de propídeo (PI), um corante não vital, que possui fluorescência vermelha e que se liga ao DNA. Com isso, identificam-se três populações celulares distintas: as células intactas (ANEX V-/PI-), as células apoptóticas (ANEX V+/PI) e as células necróticas (ANEX V+/PI+) (Fig. 4).

A Anexina V foi preparada com técnica de DNA recombinante com plasmídeo pRH291 e purificada conforme a técnica descrita por Maurer-Fogy (1989). A preparação possui uma pureza superior a 99%. A marcação com isotiocianato de fluoresceína foi conseguida através da diluição da Anexina V com o tampão contendo 50 mM de borato de sódio/hidróxido de sódio, em pH:9,0, 150 μ M de cloreto de sódio e 1 mM de EDTA. A Anexina V diluída (50 μ M) foi misturada com 50 μ M do isômero I do isotiocianato de fluoresceína por 2 horas a 37°C. A reação foi, então, finalizada pela adição de 100mM de glicina. A solução foi, posteriormente, diluída em 50mM de Tris/HCl, em pH:8,0, 80mM de cloreto de sódio e 1 mM de EDTA e subsequentemente, aplicada a uma coluna Mono Q. As proteínas ligadas foram eluídas usando um gradiente de cloreto de sódio. Os picos eluídos foram analisados para o conteúdo de proteína e absorbância a 492 nm. O complexo 1:1 estequiométrico foi identificado e usado para o experimento. O isotiocianato de fluoresceína marcado não apresenta efeitos deletérios sobre as propriedades de ligação do complexo FITC-Anexina, quando comparado com a Anexina não marcada.

O preparo das amostras consistiu na lavagem das células, duas vezes, com PBS gelado. Posteriormente, estas células foram ressuspensas em solução tampão (0,1 M HEPES/NaOH; pH:7,4; 1,4 mMNaCl; 25mM CaCl₂) a uma concentração final de 1×10^6 células/ml. Foram transferidos 100 μ l (1×10^5 células) da solução para um tubo de cultura de 5 ml e , então, adicionados 5 μ l de Anexina V-FITC e 10 μ l de PI. A solução foi agitada

suavemente e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após este período, foram adicionados 400µl de solução tampão em cada tubo e analisados pelo citômetro de fluxo FacScalibur em até uma hora. Para a população controle, foram utilizadas células não marcadas (autofluorescência), células marcadas somente com Anexina V-FITC e células marcadas somente com PI.

O iodeto de propídeo (PI) foi utilizado para verificar a integridade da membrana plasmática no ensaio da apoptose com Anexina V. Ele é um corante vital fluorescente que cora DNA e não cruza a membrana plasmática de células viáveis ou nos estágios iniciais da apoptose, pois nestas células a integridade da membrana plasmática é mantida. Nos estágios finais da apoptose ou de células não viáveis, a membrana plasmática se torna permeável, permitindo assim, a entrada do PI nestas células. A Anexina V se liga às células nos estágios iniciais da apoptose e continua ligada até a morte da célula. O PI é utilizado no ensaio do citômetro de fluxo em dupla coloração para se distinguir células nos estágios iniciais da apoptose (Anexina V+, PI-) daquelas em estágios mais avançados da apoptose ou em morte celular (Anexina V+/PI+).

O bloqueio da Anexina V foi utilizado como um controle negativo do experimento e consiste na verificação da autofluorescência das células em estudo. O preparo do material consistiu na lavagem das células por duas vezes com PBS gelado e ressuspensão em solução tampão a uma concentração de 1×10^6 células/ml. Foram transferidos 100µl desta solução (1×10^5 células) para um tubo de 5 ml e adicionado 10µl de Anexina V recombinante purificada. As células foram agitadas suavemente e incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após isso, foram adicionados 5 µl de Anexina V-FITC. A amostra foi agitada e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos e protegida da luz. Foram adicionados 400µl de solução tampão em cada tubo e analisado pelo citômetro de fluxo no período de uma hora. A compensação da fluorescência no citômetro foi ajustada a fim de evitar a sobreposição do isotiocianato de fluoresceína (FITC) ao iodeto de propídeo (PI). Foram adquiridas 10.000 eventos para a análise. A população a ser analisada foi selecionada segundo tamanho e granularidade das células. A população celular mononuclear, localizada no quadrante inferior direito foi utilizada para o cálculo do índice apoptótico. Este índice foi calculado como a porcentagem de células

Anexina V positivas e PI negativas divididas pelo número total de células avaliadas. Simultaneamente, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do Azul de Trypan e preparações por citospins coradas por May-Grünwald-Giemsa e AgNOR foram feitas para a avaliação morfológica e do padrão de proliferação celular, respectivamente.

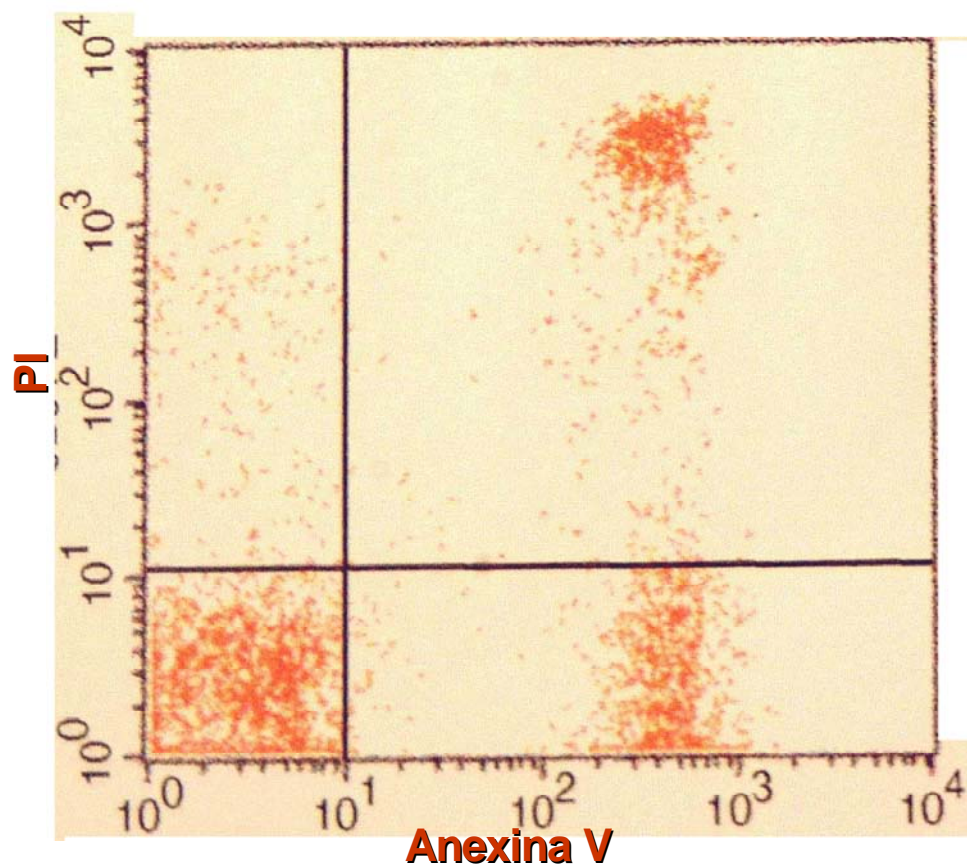


Figura 4. Dotplot da análise da apoptose por citometria de fluxo, utilizando a AnexinaV/PI.

ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR agNOR:

Os esfregaços de sangue periférico para a análise foram realizados com o mesmo material utilizado para a cultura de linfócitos. O material foi fixado em acetona por 7 minutos. Depois as lâminas foram incubadas por 10 minutos com uma mistura de nitrato de prata a 50% e gelatina (2:1). Esta coloração mostra 3 diferentes configurações (Figura 5.):

- Células com um cluster de AgNORs, que são precipitações grandes e heterogêneas, confluentes, coradas pela prata dentro de uma matriz no interior do nucléolo.
- Células com um ou dois núcleos compactos, que são precipitações condensadas no interior do núcleo.
- Células com vários pontos corados pela prata e espalhados no núcleo da célula.

Foi realizada a contagem diferencial de 100 linfócitos consecutivos , separando-os conforme os padrões acima.

Calculamos ainda o índice prognóstico (Índex), baseado no TTM somado à porcentagem de linfócitos com 1 cluster de AgNORs. Em estudos anteriores, estas variáveis mostram ser fatores prognósticos independentes no período estável da doença (METZE, 2000).

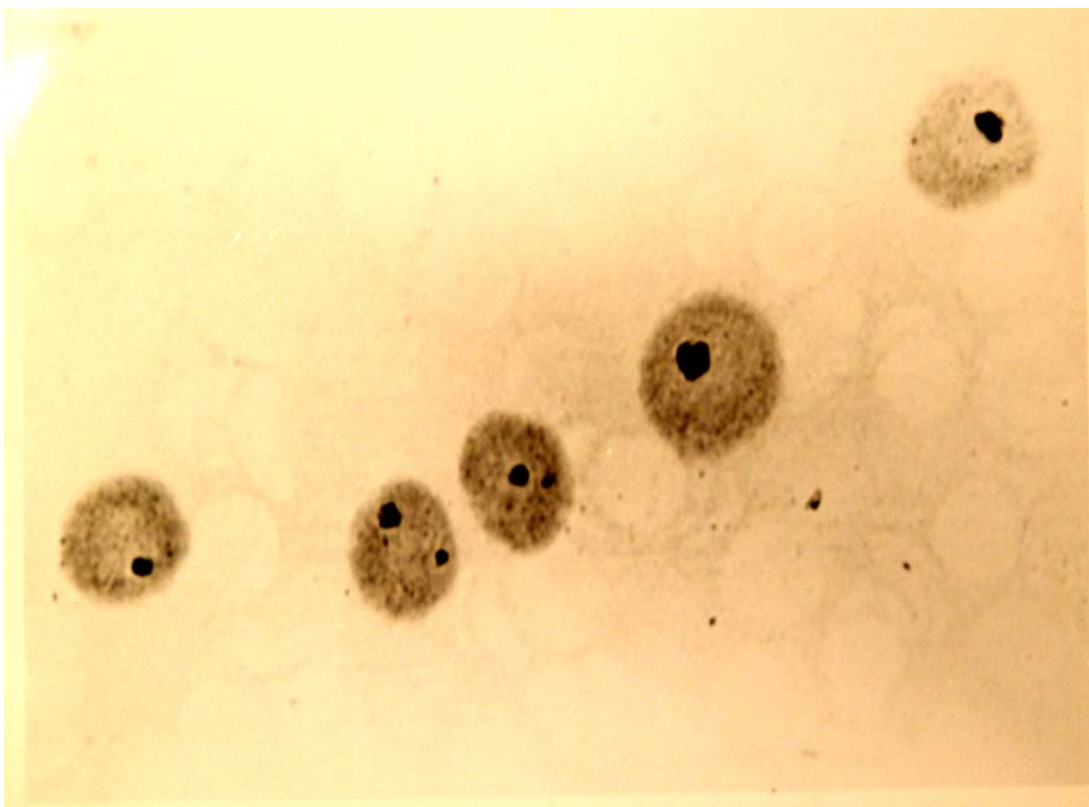


Figura 5. Configurações das AgNORs (clusters e nucléolos compactos) na LLC.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

- **Estatística descritiva:**

Inicialmente foi realizada a análise estatística descritiva dos dados de hemograma, do estadiamento, do estudo da apoptose, bem como dos linfócitos T (CD3/CD4 e CD3/CD8). Foram calculados os coeficientes de correlação de Spearman a fim de analisar as relações entre as porcentagens de células positivas para Anexina V, número absoluto de linfócitos CD3/CD8, linfócitos CD3/CD4 e os outros parâmetros clínicos e laboratoriais: idade, hemoglobina, leucócitos, linfócitos, plaquetas, TTM, Rai, Binet e a porcentagem de linfócitos com um cluster de AgNOR. Como algumas variáveis podem ser interdependentes, foram calculados os coeficientes de correlação parcial entre as variáveis acima e as células Anexina V positivas mantendo-se constantes o número de linfócitos, TTM e o número de células com um cluster de AgNORs. Foram ainda feitas as correlações parciais entre todas as variáveis e linfócitos CD8 e CD4, mantendo-se constante o número de linfócitos. Foram considerados significativos os valores de p menores de 0,05. Este método permite eliminar a influência de uma terceira variável na correlação entre as duas variáveis, mantendo esta última constante. As tabelas contendo as correlações parciais entre Anexina V, número absoluto de linfócitos CD4 e CD8 e os outros parâmetros clínicos e laboratoriais foram construídas somente com as correlações que se mostraram significantes.

Utilizando o método de regressão simples com expressão gráfica com ajuste da curva, avaliamos a relação entre o número de leucócitos (variável independente) e a porcentagem de células positivas para Anexina V (variável dependente). Este teste foi um outro meio utilizado para verificar o comportamento da porcentagem de células positivas para a Anexina V em relação ao número de leucócitos. Na curva foi usado o logaritmo natural do número absoluto de células CD8 positivas devido à sua grande variabilidade. Foram feitas as transformações linear, exponencial, logarítmica e hiperbólica dos dados e escolhida aquela com o maior valor do R^2 , sendo o R o coeficiente da correlação entre o valor real (y) e aquele previsto pela equação de ajuste da curva. As transformações logarítmicas (baseadas no número natural e) das variáveis foram utilizadas quando o histograma foi melhor aproximado pela distribuição logarítmica normal.

Por fim tentou-se separar grupos que tivessem diferentes valores para linfócitos anexina V positivos, usando os parâmetros TTM e a porcentagem de linfócitos com um cluster de AgNOR. Para isso, utilizamos a análise de clusters através do algoritmo de Ward, envolvendo a transformação logarítmica do TTM e a porcentagem de linfócitos com um cluster de AgNOR. Este recurso de agrupamento utilizou as dissimilaridades das distâncias entre as variáveis dos pacientes quando estes formaram os diferentes grupos. Neste estudo, as distâncias foram baseadas em duas variáveis: TTM e a porcentagem das células com um cluster de AgNOR. Em estudos anteriores, estas variáveis mostraram ser fatores prognósticos independentes no período estável da doença. O algoritmo de Ward foi utilizado para avaliar se os grupos formados pela análise de clusters possuía alguma diferença na apoptose espontânea, quando se compara a porcentagem de células positivas para a Anexina V pela análise de variância pelo método ANOVA. Posteriormente, comparamos a porcentagem destas células entre os três diferentes grupos. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software do Winstat, versão 3.1.



RESULTADOS

Este estudo foi realizado em 31 pacientes, sendo 24 casos virgens de tratamento e 7 casos com tratamento quimioterápico anterior. Dos casos tratados, a mediana de ciclos de quimioterapia foi de 7,5 ciclos (variando de 1 a 16 ciclos), com um intervalo mínimo de 3 meses anteriormente à coleta das amostras para a cultura. Dos pacientes avaliados, 13 eram do sexo feminino e 18 do sexo masculino; a mediana de idade foi de 74 anos, variando de 45 a 86 anos. A distribuição dos pacientes pelos diversos estadios clínicos são mostrados na tabela 7. Há uma proporção equilibrada entre os casos em estadios iniciais e avançados. Os dados do hemograma e a quantificação das células CD8+ dos pacientes encontram-se na tabela 8. Neste estudo, 7 pacientes apresentavam níveis de hemoglobina inferiores a 10g/dl e 11 pacientes com plaquetopenia inferior à $100 \times 10^9 /l$. Avaliando-se os dados do hemograma, verificamos que a mediana do número de linfócitos não foi elevada, porém apresentou uma grande variabilidade. A avaliação do TTM mostrou um comportamento semelhante, com 16 pacientes com TTM abaixo de 10, 9 pacientes com TTM entre 10 e 20 e 6 pacientes com TTM acima de 20.

Correlacionando a idade com os estadios clínicos de RAI e BINET, não se observou relação estatisticamente significativa. O mesmo ocorreu quando se analisou os estadios clínicos em relação à contagem de leucócitos e linfócitos.

Tabela 7. Características clínicas e estadiamento dos pacientes estudados:

	MEDIANA	VARIACÃO
Idade(anos)	74	45-86
Sexo(M/F)	18/23	
Estadio RAI:		
0	5	
I	7	
II	6	
III	4	
IV	9	
Estadio Binet:		
A	15	
B	4	
C	12	
TTM	12,7	3,1-28,4

TTM: índice de massa tumoral

Tabela 8. Mediana e variação da dosagem de hemoglobina, contagem de leucócitos, linfócitos, plaquetas e células CD8 positivas dos pacientes estudados:

	Mediana	Variação
Hemoglobina (g/dl)	11,9	6,0-16,5
Leucócitos (x10⁹/l)	37, 8	12,4-145
Linfócitos (x10⁹/l)	28,55	8,8-138
Plaquetas (x10⁹/l)	119	9-284
Número absoluto CD8	3,235	1-23,5

A correlação entre o nível de hemoglobina e os estádio clínicos de RAI e BINET mostrou significância estatística, com $p=0,0011$ e $p=0,0054$. A análise da contagem de plaquetas com RAI e BINET mostrou uma boa correlação, com $p=0,00054$ e $p=0,00135$, respectivamente. Isto pode refletir os casos mais avançados da doença. Os estadios clínicos mostraram uma associação positiva com o TTM, sendo de maior significância com a classificação de Binet ($p=0,00136$); para a classificação de RAI, o p foi igual a $0,0039$.

Na correlação de Spearman , a porcentagem de células marcadas com Anexina V mostrou correlação direta com a contagem de plaquetas e uma correlação inversa com a contagem de linfócitos, com o estádio clínico de Rai e Binet e com alguns marcadores de proliferação celular, ou seja, com o TTM, clusters de AgNOR e com o Índice (tabela 9). Verificamos que mantendo constantes as variáveis TTM e linfócitos circulantes, as correlações entre a porcentagem de células positivas para a Anexina V em cultura com o nível de hemoglobina, a contagem de plaquetas e estádio clínico decrescem (Tabela 9). A correlação entre o número de linfócitos e a porcentagem de células positivas para a Anexina V mostrou uma correlação inversa, expressa pela equação $Y = 55 - 7,9 \cdot \log X$, com $r^2 = 0,48$ e $R^2 = 0,23$. (Fig 6).

Tabela 9. Correlações (valores de r) entre a porcentagem de células positivas para a Anexina V e os parâmetros clínicos, laboratoriais e de proliferação dos pacientes estudados. Os valores significantes foram colocados em negrito:

	COEFICIENTE SPEARMAN	CORRELAÇÕES PARCIAIS			
	Anexina V	Leucócitos	TTM	Cl AgNOR	
	Constante	Constante	Constante	Constante	
Idade	0,006	0,098	-0,061	0,032	
Hb(g/dl)	0,348	0,234	0,176	0,262	
Linf(x 10 ⁹ /l)	-0,490		-0,287	-0,370	
Pla(x10 ⁹ /l)	0,527	0,358	0,328	0,316	
RAI	0,403	0,222	-0,057	-0,26	
TTM	-0,512	0,330		-0,409	
BINET	-0,506	0,335	-0,234	-0,363	
Cl AgNOR	-0,456	-0,315	-0,323		
Índex	-0,575	-0,400	-0,305	-0,264	
Cél CD8+	-0,012	0,293	-0,003	0,040	

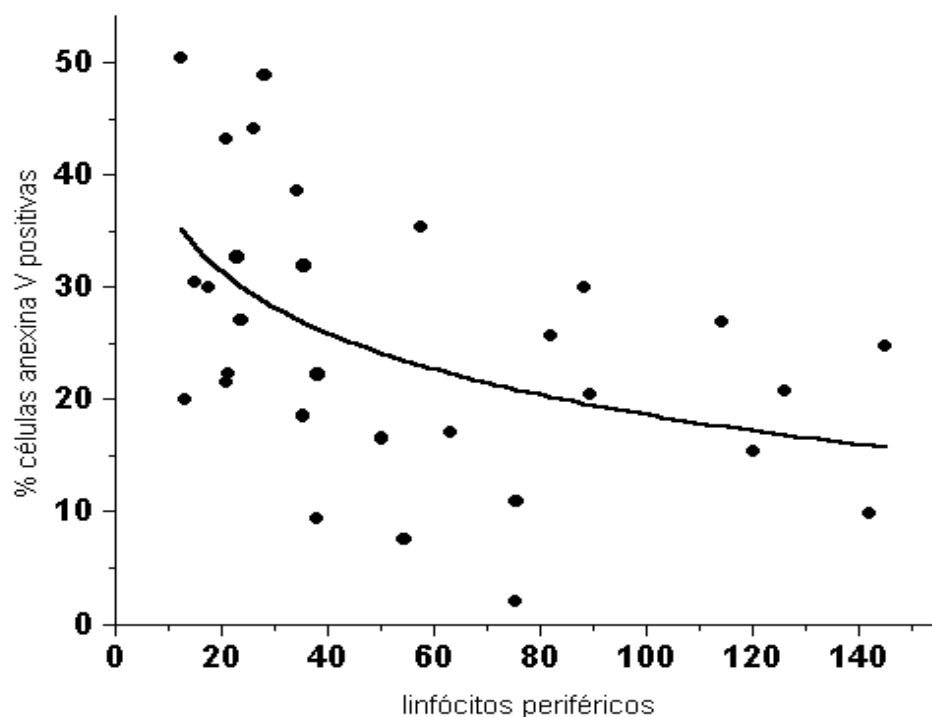


Figura 6. Relação entre a contagem de linfócitos circulantes(eixo x) e a porcentagem de células Anexina V positivas(eixo y). Esta relação segue a seguinte regressão: $Y = 55 - 7,9 \times \text{LOG}(X)$. $r = 0,48$ e $r^2 = 0,23$.

Avaliando-se as correlações entre a contagem absoluta de células CD8 positivas e as variáveis clínicas e laboratoriais, a mais importante correlação encontrada foi com a contagem de linfócitos circulantes (Tabela 10). Entretanto, se esta variável é mantida constante, conseguimos destacar a influência positiva desta no nível de hemoglobina e na contagem de plaquetas e negativamente no TTM, Índice e estágio. Isto foi expresso através de uma regressão simples com ajuste da curva seguindo a equação: $\text{Log contagem de CD3/CD8} = \text{contagem de linfócitos periféricos} / (1,1 + 0,17 \text{ contagem de linfócitos periféricos})$; com $R = 0,55$ e $R^2 = 0,308$ (Figura 7).

Tabela 10. Correlações entre a contagem de linfócitos CD8 positivos e os parâmetros do sangue periférico, estadió clínico e a taxa de proliferação dos pacientes estudados. Valores significantes em negrito:

	COEFICIENTE CORRELAÇÃO SPEARMAN (r)	CORRELAÇÃO PARCIAL C/ LEUCÓCITOS CONSTANTES (r)
IDADE	-0,137	-0,069
Hb(g/dl)	0,119	0,322
PLAQUETAS(X 10 ⁹ /l)	0,229	0,674
LINFÓCITOS(X 10 ⁹ /l)	0,493	
CÉLULAS CD4 +	0,79	0,78
% CÉLS ANEXINA V+	-0,012	0,293
TTM	-0,30	-0,425
% CLUSTERS AgNOR	0,052	-0,330
INDEX	-0,061	-0,522
RAI	-0,164	-0,470
BINET	-0,111	-0,467

Através da regressão de uma hipérbole com aproximação assintótica, obtivemos um valor hipotético máximo para as células CD3/CD8, mesmo com valores crescentes de linfócitos no sangue periférico. Vale a pena destacar que os valores da contagem de células CD3/CD8 apresentaram grande variabilidade.

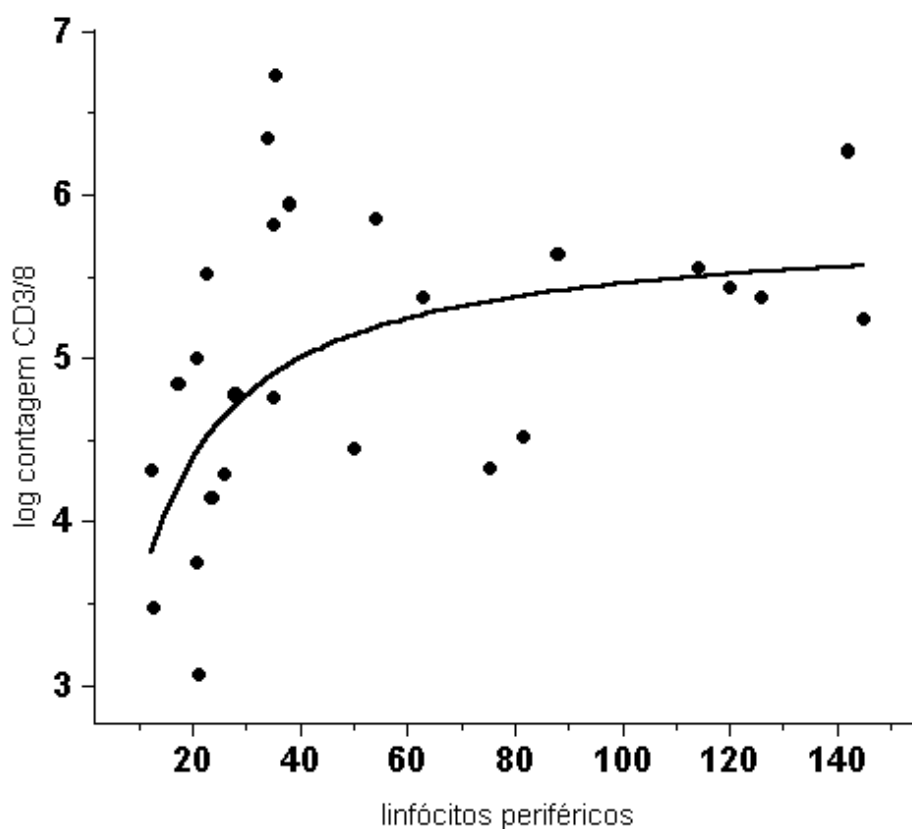


Figura 7. Relação entre o logaritmo do número de linfócitos CD3/CD8 positivos e a contagem total de linfócitos, onde $Y = \log \text{ contagem de células CD3/CD8}$; $X = \text{contagem de linfócitos circulantes}$, seguindo a seguinte equação: $*Y = X / (1,1 + 0,17xX)$ $R = 0,55$ e $R^2 = 0,308$.

A análise por clusters, segundo o algoritmo de Ward , usando-se as variáveis TTM e porcentagem de linfócitos com 1 cluster de AgNORs (os dois componentes do Índice) sugeriu a criação de três grupos. Os valores de Anexina V nestes três grupos foram significativamente diferentes (Fig 8). Para o grupo C, a mediana de células Anexina V positivas foi de 16,0%, para o grupo B, foi de 25,1% e para o grupo A, 34,1%($p=0,009$).

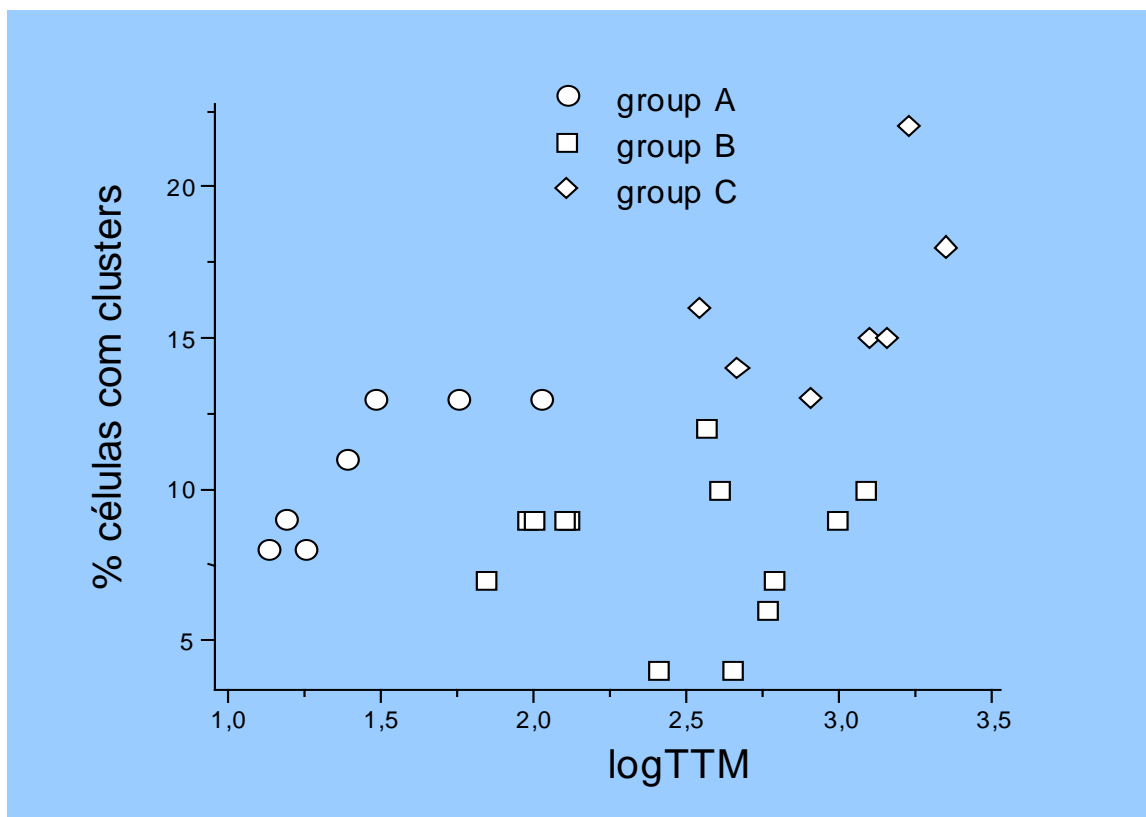


Figura 8. Relação entre os valores do logaritmo doTTM com a porcentagem das células com clusters de AgNOR, sugerindo a criação de 3 grupos, com alores significativamente diferentes de células positivas para a Anexina V.



DISCUSSÃO

As síndrome linfoproliferativas crônicas são um grupo de neoplasias de linfócitos maduros, com comportamentos biológicos distintos, o que torna o diagnóstico preciso de extrema importância para a decisão terapêutica. A citometria de fluxo nos permite fazer a análise detalhada do imunofenótipo das células leucêmicas, permitindo identificar parâmetros que podem influenciar o curso clínico, o prognóstico e, por fim, a terapêutica nesta doença.

Para analisar os eventos iniciais da apoptose utilizamos a Anexina V, como um indicador, associado a um corante não vital para estabelecer a configuração da membrana celular. As alterações precoces da apoptose consistem na exteriorização da fosfatidilserina, a qual fica exposta na superfície celular. Baseado neste fato, utilizamos como marcador deste evento a Anexina V, uma proteína de ligação do fosfolípido dependente de cálcio e com alta afinidade à fosfatidilserina. A exteriorização da fosfatidilserina para a superfície externa ocorre também na necrose, porém estes dois processos diferem entre si em relação à integridade da membrana celular. Na apoptose, a membrana celular encontra-se intacta, enquanto na necrose, está permeável. Associado à avaliação com o iodeto de propídeo (PI), que penetra nas células através da membrana celular, pudemos verificar a configuração da membrana celular e, portanto, destacar as células em apoptose neste estudo.

Este estudo incluiu os pacientes portadores de LLC atendidos na disciplina de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas, tratados e não tratados, com o intuito de avaliar a apoptose espontânea, *in vitro*, correlacionando seu índice com a proliferação celular, com a evolução clínica da doença e, em alguns casos, com a resposta ao tratamento. Alguns parâmetros clínicos e laboratoriais foram utilizados em conjunto com o estadiamento clínico para a avaliação da citocinética da doença. Foram avaliados: o nível de hemoglobina, a contagem de linfócitos e de plaquetas, os estádios clínicos de Rai e Binet, o número absoluto de células CD4 e CD8, o TTM, a porcentagem de células com clusters de AgNOR, a porcentagem de células positivas para a Anexina V e o índice prognóstico. A nossa amostragem não refletiu a prevalência dos diferentes estádios da doença observada em nosso serviço, sendo realizada uma seleção prévia para a inclusão dos casos no estudo. Isto refletiu a tentativa de se obter um maior número de pacientes com doença avançada, para que pudessem ser comparados

com os pacientes com doença estável. Paralelamente, não reflete a frequência dos diferentes estádios da doença descritos na literatura, que mostram 30% para os pacientes com estágio inicial, 60% para os estádios intermediários e 10% para os estádios avançados. Em um estudo de nosso serviço realizado em 1999, pudemos verificar a prevalência dos diferentes estádios da doença: 52% para o estágio A, 36% para o estágio B e 14% para o estágio C (METZE, 2 000). No presente estudo, obtivemos 45% dos casos no estágio A, 13% no estágio B e 42% no estágio C.

Neste trabalho, estudamos a apoptose *in vitro* dos linfócitos B circulantes dos pacientes portadores de LLC-B utilizando a técnica da Anexina V. Estas células *in vivo* mostram uma redução da susceptibilidade à apoptose e quando em meio de cultura, entram em apoptose espontaneamente. Isto pode ser devido à ação de citocinas, principalmente das interleucinas IL-2 e IL-4, do TNF α e do interferon γ (KAY, 2001; MORENO, 2001; PANAYIOTIDIS, 1993; ROJAS, 1996; MAINOU-FOWLER, 1995; FOA, 1990).

A literatura mostra que a contagem de linfócitos, a morfologia e o tempo de duplicação destas células são fatores prognósticos importantes. O valor prognóstico da morfologia dos linfócitos ainda é obscura. Alguns artigos mostram que a presença de linfócitos pleomórficos e de linfócitos clivados estão relacionados com um prognóstico ruim (BINET, 1981; DUBNER, 1978; VALLESPI, 1991). A contagem de linfócitos periféricos mostra uma correlação inversa com a sobrevida dos pacientes (LEE, 1987; HALLEK, 1997), porém alguns trabalhos não confirmam esta hipótese (GRAY, 1974; BINET, 1981). O estágio clínico, os achados histopatológicos da medula óssea, o tempo de duplicação de linfócitos e as anormalidades citogenéticas são preditores da sobrevida nestes pacientes (JULIUSSON, 1990; ROZMAN, 1995; RAI, 1999). A concentração de LDH e β 2-microglobulina séricas, a timidina quinase, o CD23 e CD25 e as mutações no gene p53 apresentam relação com o prognóstico, em alguns estudos (HALLEK, 1997; RAI, 1999). Em nosso trabalho, a contagem de linfócitos periféricos mostrou correlação inversa com a porcentagem de células Anexina V positivas, mostrando que à medida que o seu número aumenta, a porcentagem de células em apoptose diminui, ou seja, a redução na susceptibilidade à apoptose é maior nos casos com doença mais avançada.

Há evidências de que o processo de apoptose é modificado durante o curso natural da doença, sendo mais intenso nos pacientes com estadio inicial da doença (RICCIARDI, 2001; ROJAS, 1996; CALIGARIS-CAPPIO, 1996; PANAYIOTIDIS, 1993; HERAULT, 1999; ROBERTSON, 1993; FOA, 1990). Esta relação entre apoptose e os estadios da doença foram observados em nosso trabalho, como mostrado na figura 8, onde as células com menor porcentagem de células com clusters e com menor TTM, ou seja, em estadio inicial, apresentam maior porcentagem de células Anexina V positivas e, portanto, maior índice de apoptose. Com a progressão da doença, as células neoplásicas B acumulam alterações genéticas, diminuindo sua capacidade de entrar em apoptose. Este fenômeno é também associado à resistência ao tratamento. A relação entre o estágio da doença e a resposta aos análogos da purina, *in vitro*, foi descrita e observada, principalmente, nos estádios iniciais da doença (ROBERTSON, 1993). Esta diminuição na susceptibilidade à apoptose pode ser visto em nosso trabalho na figura 8, onde os pacientes com doença avançada, mostrando TTM elevados e elevada porcentagem de células com clusters, apresentam os valores de Anexina V mais baixos.

Estudamos a proliferação celular dos linfócitos circulantes na LLC pela técnica das AgNORs. Vários estudos têm mostrado que a LLC é uma doença indolente, com baixa taxa de proliferação. Poucas células estão em ciclo celular proliferativo. Por isso, é mais adequado usar um marcador de proliferação capaz de diferenciar as células em G0 das células em ciclo, como o Ki67 ou a técnica das AgNORs, na abordagem usada (LORAND-METZE, 1998). Por outro lado, estudos anteriores do nosso serviço demonstraram que a fração proliferativa dos linfócitos circulantes medida por esta técnica correlaciona-se muito bem com o estadio, com os dados do hemograma e com a duração da fase estável (LORAND-METZE, 1996; METZE, 1999; METZE, 2000). Deste modo, foi um bom parâmetro para comparar com a taxa de apoptose *in vitro*, como mostraram os nossos resultados.

A diferenciação entre os clusters, pontos e os núcleos compactos pequenos é importante para a análise dos linfócitos na LLC. O método de AgNOR é facilmente reprodutível, não demanda tempo nem análise quantitativa de imagem para sua avaliação, destacando sua factibilidade na prática clínica. Na avaliação das configurações das

AgNORs, os linfócitos que apresentam um cluster correspondem à fração proliferativa circulantes nestes pacientes e os linfócitos normais, em repouso metabólico, apresentam nucléolos compactos, representando as célula em fase G0. Há uma correlação direta entre a porcentagem de células com clusters de AgNOR e o TTM, relação mostrada neste estudo na tabela 8. Já em relação aos clusters de AgNOR com o tempo de duplicação dos linfócitos, esta relação é inversa. Esta correlação também foi vista com a idade e a taxa de hemoglobina (LORAND-METZE, 1996) e com a resposta à quimioterapia. A porcentagem de células com um cluster de AgNOR é também um fator prognóstico independente prevendo a duração da fase estável da doença nos pacientes com LLC (METZE, 2000) e sua configuração parece mudar com a evolução da doença e após o tratamento. A porcentagem de células com um núcleo compacto ao diagnóstico pode ser usado como um fator preditivo importante de quimiossensibilidade nestes pacientes (METZE, 1999). Foi demonstrado, recentemente, a importância da quantificação do AgNOR em relação à remissão completa em pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (PICH, 1998). Os fatores prognósticos na LLC têm sido associados não só à sobrevida global, bem como, à previsão de progressão da doença e resposta ao tratamento, permitindo estabelecer critérios para o início da quimioterapia (DIGHIERO, 1991; CHESON, 1996; ZIEBEL, 1998; MOLICA, 1999). Sabe-se que a influência da idade é importante quando analisados os fatores prognósticos, mostrando-se que com o avançar da idade, piora-se o prognóstico da doença. Esta piora, porém, não está ligada às características específicas da doença (HALLEK, 1997).

O estágio de Binet está relacionado com a sobrevida global e à sobrevida livre de tratamento (French Cooperative Group on CLL), com maior utilidade para os casos indolentes (Binet A'e Rai 0) e para os casos mais avançados (Binet C e Rai III e IV). Para os casos intermediários, é importante incluir marcadores da cinética tumoral e de agressividade da doença, como o TTM, o tempo de duplicação dos linfócitos e a taxa de proliferação, que nestes pacientes apresentam grande variabilidade. Observamos a associação positiva dos estádios clínicos com o TTM, também comprovada em estudos anteriores (LORAND-METZE, 1996). Outros fatores relacionados ao curso da doença são descritos, como as alterações cariotípicas, o grau de expressão e liberação de moléculas de adesão e os fatores relacionado à angiogênese (AGUAYO, 2000).

Os marcadores de proliferação, tempo de duplicação de linfócitos (TDL), a porcentagem de células em fase S por citometria de fluxo, o índice de PCNA ou KI-67 apresentam relação com o estágio, progressão da doença e com a resposta ao tratamento (MOLICA, 1999; ASTSATUROV, 1997; ZWIEBEL, 1998).

Em nosso estudo, encontramos uma correlação inversa entre o número de células com um cluster de AgNOR e a porcentagem de células que entram em apoptose espontânea em cultura. Embora o coeficiente desta correlação diminuiu quando foi feita a correlação parcial mantendo-se o número de linfócitos e o TTM constantes, ainda se expressou uma fraca correlação entre estas variáveis. Entretanto, estes achados confirmam o conceito de que clones de células com um tempo de duplicação curto, geralmente são encontrados nos casos mais avançados, possuindo uma menor capacidade de se submeterem à apoptose espontânea. Estudos anteriores mostram que a porcentagem de células com um cluster de AgNOR e o TTM foram fatores prognósticos independentes quando analisados o período livre de tratamento. Além disso, o índice prognóstico, baseado nestes dois parâmetros, apresentou uma correlação elevada com as células positivas para a Anexina V entre todos os parâmetros avaliados (METZE, 2000).

Usando-se o TTM e a taxa de proliferação pudemos separar três principais grupos que diferem significativamente na sua capacidade de se submeter à apoptose. Os valores mais baixos de Anexina V foram encontrados no grupo de pacientes com porcentagens elevadas de células com um cluster de AgNOR e com valores altos de TTM. Em concordância com a literatura, observamos que os pacientes com elevada porcentagem de células com um cluster de AgNOR e/ou com TTM alto, ou seja, com doença progressiva apresentam menor susceptibilidade à apoptose espontânea *in vitro*.

Alguns estudos mostram que a inibição da apoptose observada nas células B clonais é parcialmente devida à produção de citocinas pelos linfócitos T, CD3+/CD8+. Portanto, a análise das células CD3+/CD8+ no sangue periférico é mandatória. A principal correlação entre estas células e os outros parâmetros foi encontrada com o número de linfócitos periféricos. Pudemos observar que à medida que o número de linfócitos aumenta, ou seja, com a progressão da doença, a porcentagem de células positivas para a Anexina V

decrece. Isto evidencia que a diminuição na susceptibilidade à apoptose ocorre paralelamente à progressão da doença (Figura 6).

A curva de ajuste sugeriu uma regressão hiperbólica modificada comum a aproximação assintótica a um valor máximo hipotético para as células CD3+/CD8+. Esta equação mediria uma estimulação imunológica dos linfócitos CD3+/CD8+ pelos linfócitos neoplásicos. O valor máximo de aproximadamente 3.36×10^9 células/l da equação que representa um valor médio teórico no pico de estimulação imune dos pacientes com LLC. Há, entretanto, as variações individuais, como mostrado na curva.

As correlações parciais entre os valores de CD8 e os outros parâmetros clínicos e laboratoriais, quando a variável do número de linfócitos foi mantida constante, sugeriu que, independentemente da contagem de leucócitos periféricos, nos casos com valores baixos de hemoglobina e plaquetas, ou seja, nos casos com doença avançada (Binet C), pode haver uma diminuição na produção de linfócitos CD8, ou seja, uma redução da resposta imune. Não foi observada nenhuma correlação com os linfócitos CD4+.

Com isso, pudemos observar que o estudo da apoptose espontânea na LLC-B pelo método da Anexina V, associado ao estudo da proliferação, em nosso caso pelo método das AgNORs e à avaliação das subpopulações de linfócitos T(CD4 e CD8), nos permitiu avaliar a citocinética desta doença, que apresenta comportamentos tão distintos. Verificamos que com a progressão da doença, ocorre um aumento do TTM e da porcentagem das células em proliferação, correlacionado ao aumento na população de linfócitos CD8+ e à menor susceptibilidade à apoptose.



CONCLUSÕES

Em relação ao objetivo inicial deste trabalho, pudemos concluir que nos estados iniciais da doença, a apoptose dos linfócitos da LLC-B encontra-se mais evidente e nos casos com doença avançada, este processo encontra-se bloqueado. A atividade proliferativa destas células, estudada pela técnica das AgNORs, mostrou que os pacientes com doença em estadio inicial apresentam pequeno número de células com um clusters, o que sugere uma baixa atividade mitótica e os pacientes com doença avançada, apresentam porcentagens maiores destas células. Relacionando os parâmetros clínicos e de estadiamento, pudemos observar que um baixo índice de massa tumoral, avaliado pelo TTM e uma taxa de proliferação reduzida, avaliada pelas células com clusters de AgNORs, foram encontrados naqueles pacientes com maiores índices de apoptose espontânea. Já nos pacientes com grande massa tumoral e com taxas elevadas de proliferação, a apoptose encontrava-se bloqueada, refletindo a importância destes fatores na progressão da doença. Observamos uma perda na capacidade destas células de se submeterem à apoptose *in vitro*, espontânea ou induzida por quimioterapia e um aumento na capacidade de proliferação, à medida que a doença progride.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

1. ADAMI, F.; GUARINI, A.; PINI, M. et al – Serum levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Eur J Cancer**, 30^A (9): 1259-1263, 1994.
2. AGUAYO, A. ; KANTARJAN, H.; MANSHOURI, T. et al – Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. **Blood**, 96 (6): 2240-2245, 2000.
3. AGUILAR-SANTELISES, M.; ROTTENBERG, M.E.; LEWIN, N. et al – Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. **Int J Cancer**, 69: 114-119, 1996.
4. ALLEN, P. D.; BUSTIN, S. A. and NEWLAND, A.C. – The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. **Blood Reviews**, 7: 63-73, 1993.
5. ALLEN, R.T.; HUNTER III W.J. and AGRAWAL, D.K. – Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 37: 215-228, 1997.
6. ASTSATUROV, I. A.; SAMOILOVA, R.S.; IAKHNINA, E.I. et al – The relevance of cytological studies and Ki-67 reactivity to the clinical course of chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Lymphoma**, 26 (3-4): 337-342, 1997.
7. AVIRAM, A.; RABIZADEH, E.; ZIMRA, Y. et al – Expression of bcl-2 and bax in cells isolated from B-chronic lymphocytic leukemia patients at different stages of the disease. **Eur J Haematol**, 64:80-84, 2000.
8. AWWAD, H.K.; BADCEB, A.D. ; MANOUD, G.E. et al – The effect of splenic X-irradiation on the ferrokinetics of chronic leukemia with a clinical study. **Blood**, 29 (2): 242-256, 1967.
9. BACCARANI, M.; CAVO, M; GOBBI, M. et al – Staging of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, 59 (6): 1191-1196, 1982.

10. BARTIK, M.M.; WELKER, D. and KAY, N.E. – Impairments in immune cell function in B cell chronic lymphocytic leukemia. **Semin Oncol**, 25(1): 27-33, 1998.
11. BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T. et al – Proposals for the classification of chronic(mature) B and T lymphoid leukemias. **J Clin Pathol**, 42: 567-584, 1989.
12. BERTHO, A.L.; SANTIAGO, M.A. and COUTINHO, S.G. – Flow cytometry in the study of cell death. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 95(3): 429-433, 2000.
13. BINET, J. L.; MENTZ F. and MERLE-BERAL, H. - Apoptosis in blood diseases. **Hematology and cell therapy**, 38: 253-264, 1996.
14. BINET, J.L.; AUQUIER, A.; DIGHIERO, G. et al – A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. **Cancer**, 48: 198, 1981.
15. BINET, J.L.; CATOVSKY, P. CHANDRA, P. et al – Chronic lymphocytic leukaemia: proposal for a revised prognostic staging system. **Br J Haematol**, 48: 365-367, 1981.
16. BINET, J.L.; PLUNKETT, W.; ROBERTSON, B. et al – What does apoptosis mean in CLL? **Leuk Lymphoma**, 22(2): 47-52, 1996.
17. BROWN, D.G.; SUN, X-M.and COHEN, G.M. – Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior internucleosomal fragmentation. **J Biol Chem**, 268: 3037-3041, 1993.
18. BULLRICH, F.; NEGRINI, M. and CROCE, C.M. – Molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. The American Society of hematology education program book, 255-261, 1999.
19. BYRD, J.C.; FLINN, I.W. and GREVER, M.R. – Introduction: chronic lymphocytic leukemia. **Semin Oncol**, 25 (1): 4-5, 1998.

20. CALIGARIS-CAPIO, F. - B-Chronic Lymphocytic Leukemia: A malignancy of anti-self B cells. **Blood**, 87(1): 1996, 1996.
21. CALIGARIS-CAPIO, F.; GOTTARDI, D.; ALFARANO, A. et al – The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia. **Blood Cells**, 19:601-613, 1993.
22. CALIGARIS-CAPPIO, F. and HAMBLIN, T.J. – B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. **J Clin Oncol**, 17 (1): 399-408, 1999.
23. CALIGARIS-CAPPIO, F., GRANZIERO, L., GEUNA, M. et al – Towards a better understanding of the biology of B-chronic lymphocytic leukaemia. **6th European Haematology Association - Educational Book**, 102-105, 2001.
24. CANET, V.; MONTMASSON, M.P.; USSON, Y. et al – Correlation between silver-stained nucleolar organizer region area and cell cycle time. **Cytometry**, 43:110-116, 2001.
25. CASTEJON, R.; VARGAS, J.A.; ROMERO, Y. et al – Modulation of apoptosis by cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Cytometry**, 38(15): 224-230.
26. CHERN, J.; LEE, Y.; YANG, M et al – Usefulness of AgNOR score in differentiating benign from malignant pilmonary aspiration cytology. **Acta Cytol**, 41: 393-398, 1997.
27. CHESON, B.D.; BENNETT, J.M.; RAI, K.R. et al – Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the national cancer institute sponsored working group. **Am J Haematol**, 29:152-163, 1988.
28. CHESON, B.D.; BENNETH, M.G.; KAY, N. et al – National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. **Blood**, 87(12): 4990-4997, 1996.
29. CHIU, L.; CHERWINSKI, H.; RANSOM, J. et al – Flow cytometric ratio analysis of the Hoechst 33342 emission spectrum: multiparametric characterization of apoptotic lymphocytes. **J Immunol Methods**, 189 (2): 157-171, 1996.

30. CONSOLI, U.; EL-TOUNSI, I.; SANDOVAL, A. et al – Differential induction of apoptosis by fludarabine monophosphate in leukemic B and normal T cells in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, 5(1): 1742-1748, 1998.
31. CORDONE, I.; MAIS, S.; MAURO, F.R. et al – P53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. **Blood**, 91: 4342-4349, 1998.
32. CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R. and EGAN, M.J. – How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. **J Pathol**, 158: 185-188, 1989.
33. CROCKER, J.; MACARTNEY, J.C. and SMITH, P.J. – Correlation between DNA flow cytometry and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. **J. Pathol**, 154: 151-156, 1988.
34. DERENZINI, M.; TRÈRE, D. PESSI, A. et al – Nucleolar function and size in cancer cells. **Am J Pathol**, 152 (5): 1291- 1297, 1998.
35. DERENZINI, M; NARDI, F; FARABEGOLI, F et al – Distribution of silver-stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. **Acta Cytol**, 33(4): 491-498, 1989.
36. DIANZANI, U.; OMEDE, MARMONT FILIPPO et al – Expansion of T cells expressing low CD4 or CD8 levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease status and neoplastic phenotype. **Blood**, 83(8): 2198-2205, 1994.
37. DIGHIERO, G.; TRAVADE, P.; CHEVRET, S. et al – B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. **Blood**, 78(8): 1901-1914, 1991.
38. DiGIUSEPPE, J. A. and BOROWITZ, M.J. – Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. **Seminars Oncology**, 25(1): 6-10, 1998.
39. DiGIUSEPPE, J.A. and KASTAN, M.B. – Apoptosis in haematological malignancies. **J Clin Pathol**, 50: 361-364, 1997.

40. DUBNER, H.N.; CROWLEY, J.J. and SCHILLING, R.F. – Prognostic value of nucleoli and cell size in chronic lymphocytic leukemia. **Am J Hematol**, 4: 337-341, 1978.
41. EVANS, A.T.; ORRELL, J.M. and GRANT, A. – Re-evaluating silver-stained nucleolar organizer regions in problematic cutaneous melanocytic lesion: a study with quantitation and pattern analysis. **J Pathol**, 165: 61-67, 1991.
42. FAGUET, G.B. – Chronic lymphocytic leukemia: um update review. **J Clin Oncol**, 12 (9): 1974-1990, 1994.
43. FERLINI, C.; KUNKL, A.; SCAMBIA, G. et al – The use of apostain in identifying early apoptosis. **J Immunol Methods**, 205: 95-101, 1997.
44. FINN, W.G.; THANGAVELU, M.; YELAVARTHI, K.K. et al – Karyotype correlates with peripheral blood morphology and immunophenotype in chronic lymphocytic leukemia. **Hematopathology**, 105(4): 458-467, 1996.
45. FOA, R.; MASSAIA, M.; CARDONA, S. et al – Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. **Blood**, 76(2): 393-400, 1990.
46. FONN, K.A.; RAI, K.R. and GALE, R.P. – Chronic lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy. **Ann Int Med**, 113: 525-539, 1990).
47. FRENCH COOPERATIVE GROUP ON CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA – Natural history of stage A chronic lymphocytic leukaemia untreated patients. **Br J Haematol**, 76: 45-57, 1990.
48. GALE, R.P.; CALIGARI-CAPIO, F.; DIGHIERO, F. et al – Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, 8:1610-1614, 1994.
49. GARAND, R. and ROBILLARD, N. – Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classifications. **Hematol Cell Ther**, 38: 471-486, 1996.

50. GHANI, A.M. and KRAUSE, J.R. – Investigation of cell size and nuclear clefts as a prognostic parameters in chronic lymphocytic leukemia. **Cancer**, 58: 2233-2238, 1986.
51. GOOLSBY, C.L.; KUCHNIO, M.; FINN, W.G. et al – Expansion of clonal and oligoclonal T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia are primarily restricted to the CD3+CD8+ T-cell population. **Cytometry**, 42: 188-195, 2000.
52. GRAY, J.; JACOBS, A. and BLOCK, M. – Bone marrow and peripheral blood lymphocytosis in the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. **Cancer**, 33:1169, 1974.
53. GROTTTO, H.Z.W.; LORAND-METZE, I. and METZE, K. – Nucleolar organizer regions in normal hematopoiesis: relationship to cellular proliferation and maturation. **Nouv Rev Fr Hematol**, 33:1-4, 1991.
54. GUNZ, F.W.. – The epidemiology and genetics of the chronic leukemias. **Clin Haematol**, 6: 3, 1977.
55. HALLEK, M.; KUHN-HALLEK, I. and EMMERICH, B. – Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, 11(2): S4-S13, 1997.
56. HAMBLIN, T.J.; OSCIER, D.J. and YOUNG, B.J. – Autoimmunity in chronic lymphocytic leukemia. **J Clin Pathol**, 39: 713-719, 1986.
57. HAMEL W.; DAZIN P. et al- Adaption of a simple flow cytometric assay to identify different stages during apoptosis. **Cytometry**, 25(2): 173-181, 1996.
58. HANADA, M.; DELIA, D.; AIELLO, A. et al – Bcl-2 Gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, 82:1820-1828, 1993.
59. HANSEN, M.M. – Chronic lymphocytic leukemia. Clinical studies based on 189 cases followed for a long time. **Scan J Haematol**, 18:3 (suppl), 1973.
60. HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; STEIN, H. et al – A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from yhe International Lymphoma Study Group. **Blood**, 84:1361-1392, 1994.

61. HERAULT, O.; COLOMBAT, P.; DOMENECH, J. et al – A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogeneous cell population. **Br J Haematol**, 104 (3): 530-537, 1999.
62. HOFFBRAND, A.V.; PANAYOTIDIS, P.; REITTIE, J. et al – Autocrine and paracrine growth loops in chronic lymphocytic leukemia. **Semin Hematol**, 30: 306-317, 1993.
63. HORWITZ, M.; GOODE, E. and JARVIK G.P.- Anticipation in familial leukemia. **Am J Hum Genet**, 59:990-996, 1996.
64. IBRAHIM, S; KEATING, M; DO, K. A. et al – CD 38 expression as na important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, 98 (1): 181-186, 2001.
65. JENNINGS, C.D. and FOON, K.A. – Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. **Blood**, 90(8): 2863-2892, 1997.
66. JULIUSSON, G; OSCIER, D.G.; FITCHETT, M. et al – Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. **N Engl J Med**, 323 (11): 720-724, 1990.
67. KANE, A. B. - Redefining cell death. **Am J Pathol**, 146: 1-2, 1995.
68. KAY, N.E. and JOHNSON, J.D. – T cell population in chronic lymphocytic leukemia: abnormalities in distribution and *in vitro* receptor maturation. **Blood**, 54: 540-544, 1979.
69. KAY, N.E.; HAN, L. and WILLIAMS, G. – Interleukin 4 content in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) B cells and blood CD8+ T cells from B-CLL patients: impact on clonal B-cell apoptosis. **Br J Haematol**, 112: 760-767, 2001.
70. KEATING, M.J. – Improving the complete remission rate in chronic lymphocytic leukemia. 41th Annual Meeting of the American Society of Hematology- Educational Book: 262-269, 1999.
71. KERR, J. F. R.; WINTERFORD C. M. and HARMON, B.V. - Apoptosis. **Cancer**, 73(8): 2013-2026, 1994.

72. KOOPMAN G., REUTELINGSPERGER C.P. et al- AnnexinV for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, 84(5): 1415-1420, 1994.
73. KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; KUIJTEN, G.A.M. et al – Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, 84(5): 1415-1420, 1994.
74. LAURIA, F.; MANTOVANI, V.; FIERRO, M.T. et al – T-cell functional abnormality in B-chronic lymphocytic leukemia: evidence of a defect of the T-helper subset. **Br J Haematol.**,54:277-281, 1983.
75. LAZARIDOU, A.; MIRAXTSI, C.; KORANTZIS, J. et al – Simultaneous detection of bcl-2 protein, trisomy 12, retinoblastoma and p53 monoallelic gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization(FISH): relation to disease status. **Leuk Lymphoma**, 36(5-6): 503-512, 2000.
76. LEE J.S.; DIXON, D.O.; KANTARJIAN, H.M. et al – Prognosis of lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. **Blood**, 69(3): 929-936, 1987.
77. LEEK, R.D.; ALISON, M.R. and SARRAF, C.E. – Variation in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions in non-proliferating and proliferating tissues. **J Pathol**, 165: 43-51, 1991.
78. LODA, M.; CUKON, B.; TAM, S.W. et al – Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27 in aggressive colorectal carcinomas. **Nature Medicine**, 3: 231-234, 1997.
79. LORAND-METZE I.; CARVALHO, M.A. and METZE, K. – Relationship between morphometric analysis of nucleolar organizer regions and cell proliferation in acute leukemias. **Cytometry**, 32:51-56, 1998.
80. LORAND-METZE I.; METZE K.- AgNOR clusters as a parameter of cell kinetics in chronic lymphocytic leukemia. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, 49: M357-M360, 1996.

81. MADNO, G e JORIS, I - Apoptosis, oncosis and necrosis - an overview of cell death. **Am J Pathol**: 3-19, 1995.
82. MAINOU-FOWLER, T.; COPPLESTONE, J.A. and PRENTICE, A.G. – Effect of interleukins on the proliferation and survival of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. **J Clin Pathol**, 48: 482-487, 1995.
83. MAJNO, G. and JORIS, I. – Apoptosis, oncosis and necrosis: na overview of cell death. **Am J Pathol**, 146 (1): 3-15, 1995.
84. MARTIN, A.P.; MARTIN, E.R.; SUÁREZ, J.G. et al – A low blood lymphocyte count is associated with an expansion of activated cytotoxic lymphocytes in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Eur J Haematol**, 59:89-99, 1997.
85. MATUTES, E.; OSCIER, D.; GARCIA-MARCO, J. et al –Trissomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. **Br J Haematol**, 92: 382-388, 1996.
86. MATUTES, E.; WESCHLER, A.; GOMEZ, R. et al – Unusual T-cell phenotype in advanced B-chronic lymphocytic leukemia. **Br J Haematol**, 49: 635-642, 1981.
87. McCONKEY D. J.; ORRENIUS, S. and JONDAL M.- Cellular signaling in programmed cell death (apoptosis). **Immunol Today**,11: 120-129, 1990.
88. McCONKEY, D. J.; SANTELSES, M. A. et al cols. - **J Immunol**,146(3): 1072-1076, 1991.
89. MENZEL, T.; RAHMAN, Z.; CALLEJA, E. et al – Elevated intracellular level of basic fbroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. **Blood**, 87 (3): 1056-1063, 1996.
90. MELO, J.V.; CATOVSKY, D.; GREGORY, W.M. et al – The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, 65: 23-29, 1987.

91. MENTZ, F; MERIE-BERAL, H et al. - Theophylline, a new inover of apoptosis in LLC: role of ciclic nucleotides. **Br J Haematol**, 90: 957-959, 1995.
92. MERCHANT, S.H.; GONCHOROFF, N.J. and HUTCHISON, R.E. – Apoptotic index by Annexin V flow cytometry: adjunct to morphologic and cytogenetic diagnosis os myelodislplastic syndromes. **Cytometry**, 46:28-32, 2001.
93. METZE, K.; CHIARI, A.C.; ANDRADE, F.L. et al – Changes in AgNOR configurations during the evolution and treatment of chronic lymphocytic leukemia. **Hematol Cell Therapy**, 41: 205-210, 1999.
94. METZE, K.; LOBO, A.M. and LORAND-METZE, I. – Nucleolus organizer regions (AgNORs) and total tumor mass are independent prognostic parameters for treatment-free period in chronic lymphocytic leukemia. **Int J Cancer**, 89:440-443, 2000.
95. MICHALIDES, R.J.A.M.- Cell cycle regulators: mechanisms and their role in aetiology, prognosis and treatment of cancer. **J Clin Pathol**, 52: 555-568, 1999.
96. MIRE-SLUIS, A.R. and THORPE, R.- Interleukin-4 proliferative signal transduction involves the activation of a tyrosine-specific phosphatase and the dephosphorylation of an 80 kDa protein. **Journal of Biological Chemistry**, 1991.
97. MOLICA, S.; LEVATO, D.; CASCIVILLA, N. et al – Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Eur J Haematol**, 62 (2): 117-122, 1999.
98. MONTSERRAT, E and ROZMAN, C - Chronic lymphocytic leukaemia treatment: **Blood reviews**, 164-175, 1993.
99. MONTSERRAT, E. and ROZMAN,C.- B cell chronic lymphocytic leukemia: recent progress in biology, diagnosis and therapy.**Annals of Oncology**, 8(1):93-101, 1997.
100. MONTSERRAT, E.; SANCHEZ-BISONO, J et al – Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: analysis of its prognostic significance. **Br J Haematol**, 62: 567-575, 1986.

101. MORENO, A.; VILLAR, M.L.; CÁMARA, C. et al – Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis os B-chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, 97 (1): 242-249, 2001.
102. MOUD, S.; GARDINER, A.; CORCORAN, M et al – Trissomy 12 and strutural abnormalities of 13q14 occurring in the same clone in chronic lymphocytic leukemia. **Br J Haematol**, 92:389-392, 1996.
103. MU, X.; KAY N.E; GOSLAND, M.P. et al – Analysis of blood T-cell cytokine expression in B-chronic lymphocytic leukemia: evidence for increased levels of cytoplasmic IL-4 in resting and activated CD8 T cells. **Br J Haematol**, 96:733-735, 1997.
104. O'BRIEN, S.; GIGLIO, A. Del and KEATING,M. – Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, 85(2):307-318, 1995.
105. ORMEROD, M.G. – The study of apoptotic cells by flow cytometry. **Leukemia**, 12:1013-1025, 1998.
106. ORMEROD, M.G.; SUN, X.M.; BROWN, D. et al – Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. **Acta Oncol**, 32(4): 417-424, 1993.
107. OSCIER, D. – Chronic lymphocytic leukemia. **Br J Haematol**, 105(Suppl 1): 1-3, 1999.
108. PANAYIOTIDIS, P; GANESHAGUN K. et al - IL-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in LLC-B cells in vitro. **Br J Haematol**, 85: 439-445, 1993.
109. PANGALIS, G.A.; ROUSSOU, P.A.; KITTAS, C. et al – B-chronic lymphocytic leukemia. Prognostic implication of bone marrow histology in 120 patients experience from a single hematology unit. **Cancer**, 59 (4): 767-771, 1987.
110. PEPPER C.;THOMAS A. et al - Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis. **Leuk Res**, 22(5): 439-444, 1998.

111. PEPPER, C.; HOY, T. and BENTLEY, D.P. – Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. **Br J Cancer**, 76(7): 935-938, 1997.
112. PEPPER, C.; BENTLEY, P. and HOY, T. – Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, 95: 513-517, 1996.
113. PEPPER, C.; THOMAS, A.; HOY, T. et al – Chlorambucil resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia is mediated through failed Bax induction and selection of high Bcl-2-expressing subclones. **Br J Haematol**, 104:581-588, 1999.
114. PETERSON, L.C.; BLOOMFIELD, C.D. and BRUNNIG, R.D. – Relationship of clinical staging and lymphocyte morphology to survival in chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, 45: 563-567, 1980.
115. PITCH, A.; CHIUSA, L.; AUDISIO, E. et al – Nucleolar organizer region counts predict complete remission, remission duration, and survival in adult acute myelogenous leukemia patients. **J Clin Oncol**, 16: 1512-1518, 1998.
116. PITCH, A.; CHIUSA, L. ; BOCCADORO, M. et al – AgNORs and myeloma prognosis. **Leuk Lymph**, 12: 383-394, 1994.
117. PORTER, P.L.; MALONE, K.E.; HEAGERTY, P.J. et al – Expression of cell cycle regulators p27^{kip1} and cyclin E, alone and in combination correlate with survival in young breast cancer patients. **Nature Medicine**, 3: 222-225, 1997.
118. PRITSCH, O.; MALOUM, K. and DIGHIRO, G. – Basic biology of autoimmune phenomena in chronic lymphocytic leukemia. **Seminars Oncology**, 25(1): 34-41, 1998.
119. RAI, K.R. – Chronic lymphocytic leukaemia. Current strategy and new perspectives of treatment. **Haematologica**, 84(Suppl EHA-4): 94-95, 1999.
120. RAI, K.R. – Future strategies toward the cure of indolent B-cell malignancies. New biologic therapies. **Semin Hematol**, 36 (4-Suppl 5): 12-17, 1999.

121. RAI, K.R.; SAWITSKY, A.; CRONKITE, E.P. et al – Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, 46 (2): 219-234, 1975.
122. REED, J.C. – Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. **Semin Oncol**, 25 (1): 11-18, 1998.
123. REINISCH, W.; WILHEIM, M.; HILGARTH, M. et al – Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **J Clin Oncol**, 12(10): 2146-2152, 1994.
124. REYES, E; PRIETO, A et al - Morphological variantes of leukemic cells in B chronic lymphocytic leukemia are associated with different T cell and NK cell abnormalities. **Am J Haematol**, 55: 175-182, 1997.
125. RICCIARDI, M.R.; PETRUCCI M.T.;GREGORJ, C. et al – Reduced susceptibility to apoptosis correlates with kinetic quiescenc in disease progression of chronic lymphocyt leukemia. **Br J Haematol**, 113: 391-399, 2001.
126. ROBERTSON, L.E.; CHEBB, S. et al - Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2 –CHLORO-2’deoxyadenosine and 9-beta-D-arabinosyl-2-fluoroadenine. **Blood**, 81: 143-150, 1993.
127. ROBERTSON, L.E.; PLUNKETT, W.; CONNELL, K.Mc. et al – Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome.**Leukemia**, 10:456-459, 1996.
128. ROJAS, R.; ROMAN, J; TORRES, A et al – Inhibition of apoptotic cell death in B-CLL by interferon gamma correlates with clinical stage. **Leukemia**, 10: 1782-1788, 1996.
129. ROZMAN,C. and MONTSERRAT, E. – Chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, 33(16):1052-1057, 1995.
130. SCHENA,M.; LARSSON,L.;GOTTARDI, D. et al – Growth and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, 79(11):2981-2989, 1992.

131. SCHMID, I; UITTENBOGAART, C.H. and GIORGI, J.V. – Sebsitive method for measuring apoptosis and cell surface phenothype in human thymocytes by flow cytometry. **Cytometry**, 15: 1220, 1994.
132. SCHROEDER, H.W.Jr ; DIGHIERO, G.- The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. **Imunnol Today**, 15: 288-294, 1994.
133. SHERWOOD, S.W. and SCHIMKE, R.T. – Cell cycle analysis of apoptosis using flow cytometry. **Methods Cell Biol**, 46: 77-97, 1995.
134. SHINICHI, K; JANET, A. et al - Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vivo and in vitro chemoresponses. **Blood**, 91: 3379-3389, 1998.
135. SJOBERG, J.; AGUILAR-SANTELISES, M.; SJOGREN, A.M. et al – Interleukin-10 NA expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia inversely correlates with progression of disease. **Br J Haematol**, 92 (2): 393-400, 1996.
136. SMITH, R.and CROCKER, J. – Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. **Histopathology**, 12: 113-125, 1988.
137. STHOEGER, Z.M.; STHOEGER, G.; SHTALRID, M. et al – Mechanism of autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. **Am J Hematol**, 43: 259-264, 1993.
138. TAN, P.; CADY, B.; WANNER, M. et al – The cell cycle inhibitor p27 is na independent prognostic marker in small(T1a,b) invasive breast carcinomas. **Câncer Research**, 57: 1259-1263, 1997.
139. TELFORD, W.G.; KING, L.E. and FRAKER, P.J. – Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. **Cytometry**, 13: 137-143, 1992.

140. TÖTTERMAN, T.H.; CARLSSON, M; SIMONSSON, B et al – T-cell activation and subset patterns are altered in B-CLL and correlate with the stage of the disease. **Blood**, 74(2): 786-792, 1989.
141. TRÈRE, D.; PESSION, A. and DERENZINI, M. – The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. **Exp Cell Res**, 184:131-157, 1989.
142. TSILIVAKOS, V.; TSAPIS, A.; KAKOLYRIS, S.; et al – Chrarakterization of interleukin 2 receptor on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. **Leukemia**, 8(9): 1571-1578, 1994.
143. VALLESPI, T.; MONTSERRAT, E. and SANZ, M.A. – Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtypes. A multivariate survival analysis in 146 patients. **Br J Haematol**, 77: 478-485, 1991.
144. Van ENGELAND M.; NIELAND L. J. et al - Annexin V-affinity assay: a review on na apoptosis system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry** , 31(1): 1-9, 1998.
145. VAUX, D.L. and FLAVELL, R.A. – Apoptosis genes and autoimmunity. **Curr Opinion Immunol**, 12:719-724, 2000.
146. VERMES I.; HAANEN C.; STEFFEN-NAKKEN, H. et al - A novel for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J.Immunol Methods**, 184(1): 39-51, 1995.
147. VERMES, I.; HAANEM C.; RICHEL, D.J. et al - Apoptosis and secondary necrosis of lymphocytes in culture. **Acta Haematol**, 98: 8-13, 1997.
148. VRHOVAC, R.; DELMER, A; TANG, R. et al – Pronostic significance of the cell cicle inhibitor p27^{kip1} in chronic B-cell lymphocytic leukemia. **Blood**, 91: 4694-4700, 1998.
149. WACHTLER, F.; SCHWARZARCHER, H.G. and ELLINGER, A. – The influence of the cell cycle on structure and number of nucleoli in cultured human lymphocytes. **Cell Tissue Res**, 255 (1): 155-163, 1982.

150. WIERNIK, P.H.; ASHMIN, M.; HU, X.P. et al – Anticipation in familial chronic lymphocytic leukemia. **Br J Haematol**, 113: 407-414, 2001.
151. ZHANG G.; GURTU V. et al - Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. **Biotechniques**, 23(3): 525-531, 1997.
152. ZUPO, S.; ISNARDI, L.; MEGNA, M. et al – CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. **Blood**, 88(4): 1365-1374, 1996.
153. ZWIEBEL J.A. & CHESON, B.D. – Chronic Lymphocytic Leukemia: Staging and Prognostic Factors. **Semin Oncol**, 25(1): 42-59, 1998.



ANEXOS

Dados citocinéticos dos pacientes

	Mediana	Variação
% células Anexina V	24,8	2,0-50,4
AgNOR		
%célts com 1 cluster	10,0	4,0-22,0
%célts 1N	62,4	50,0-76,0
%célts 2N	22,4	5,0-37,0

Tabela dos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes

NOME	DN	HB	LEUC	LINF	PLQ	GG	BAÇO	TTM	RAI	BINET	ANEX	CD3/CD8	GAMA
LNO	15/08/1927	6.6	37800	22500	9000	6	15	27.1	4	C	9.4	NR	NR
OI	27/02/1924	11.9	51900	42900	80000	1.5	14	22.5	4	C	NR	1.7	
CAS		12,2	17300		170000	0	0	4.2	0	A'	43.1	7.1	NR
IMR	13/09/1919	12.2	89200	72400	107000	1.5	8	13	2	A''	26.49	NR	1.69
JFV	15/02/1931	6,0	20400	19100	113000	4	10	18.3	3	C	2.03	NR	NR
ACO	29/12/1939	13.9	20900	14700	1270000	9.7	10	23.5	2	A''	21.5	2.02	1.46
MBS	27/10/1921	11.1	57400	52300	60000	0	0	7.23	4	C	35.42	NR	0.89
MFF	18/07/1913	13.9	34000	26300	174000	6	0	11.1	1	A'	38.6	16.8	0.95
VB	29/08/1923	13.6	24100	19300	124000	0	0	4.39	0	A'	48.86	4.23	0.95
FBM	05/10/1922	8.6	36500	33200	9000	3	4	12.76	4	C	9.79	3.35	NR
OD	29/05/1927	11.7	126800	104800	60000	3.2	15	28.4	4	C	20.77	1.7	NR
VOL	18/04/1923	9.1	15300	8900	251000	2	0	4.98	3	C	30.45	NR	NR
VS	15/01/1931	12.6	31100	24700	76000	0	15	19.96	4	C	44.05	2.8	0.91
MAS	02/06/1924	13.8	16200	12400	185000	0	0	3.5	0	A'	50.38	6	1.1
RAS	04/10/1939	16.5	36000	28000	154000	3	0	8.29	1	A'	22.22	10	1.12
OB	27/05/1927	15.5	35100	26700	149000	3	0	8.16	1	A'	22.27	9.57	1.01
AR	29/04/1945	15.6	22800	16200	281000	0	0	4.02	0	A'	26.13	10.9	0.86
MMGM	06/02/1940	11.8	17400	9700	247000	0	0	3.11	0	A''	19.8	7.3	0.45
RFJ	07/12/1927	12.6	54300	44000	160000	5	2	13.6	2	B	7.54	6.4	1.56
FRE	10/06/1914	14.2	62900	53455	113000	0	0	7.31	0	A''	17.08	3.43	0.35
JFS	15/08/1926	11.9	88100	74100	116000	0	6	14.6	2	A''	29.93	3.17	0.95
EEE	15/01/1922	11.6	114200	99200	163000	2	3	14.95	2	B	26.91	2.26	NR
JNA	24/12/1934	14.6	23600	18500	172000	6	0	6.3	1	A'	27.06	2.67	0.73
NMSL	13/08/1945	11.8	81800	71400	153000	1	5	14.44	2	A'	25.71	1.12	0.57
MAAG	08/02/1955	13.3	35400	29500	219000	2	0	7.43	1	B	31.9	23.53	NR
GC	05/09/1916	6	145000	131800	80000	1.5	9	21.9	4	C	24.8	1.3	NR
BF		15	75400	65000	77000	0	0	8.06	0	A''	10.88	1	NR
FA	09/06/1948	6	120000	104800	38000	5	10	25.19	4	C	15.36	1.9	NR
EBM	18/06/1916	10.9	12900	8800	97000	0.4	0	3.36	3	C	19.96	25	NR
AM	24/08/1926	9.8	21200	18200	66000	3	4	11.2	4	C	22.33	1.01	NR
LAM	18/10/1925	10.6	35300	29100	172000	3	8	16.3	3	B	18.53	3.35	NR

Tabela dos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes

NOME	LDH	CL	HB2	LEUC2	LINF2	PLQ2	TTM2	AN2	CL2	TR1S/2N	TEMPO
LNO	NR	59	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	S	0
OI	302		11.8	21300	13200	86000	9.52	16.5		S	0
CAS	NR									N	NR
IMR	173	8					10.53			S	20
JFV	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	S	0
ACO	479	NR	NR	NR	NR	NR		NR	NR	S	2
MBS	124		10.3	150000	78700	81000	3.3			S	1
MFF	NR	4	15.3	34390	26290	142000	5.11			N	173
VB	342	7	14.6	42130	35530	159000	5.95			N	29
FBM	NR	8	8.8	33900	31400	21000	14.43	43.56		S	0
OD	221	9	15.6	85500		109000		9.5		S	17
VOL	506	14	9.1	168000	137000	95000	16.45			S	12
VS	494	12	11.8	28400	21900	117000	11.4			S	0
MAS	339	4	14.4	32990	26420	162000	5.13			N	45
RAS	NR	5	17.6	78800	62900	205000	4.84			S	29
OB	NR	NR	15.4	37800	30100	141000	5.48			N	30
AR	340	NR	16.9	30390	21990	284000	4.6			N	18
MMGM	718	NR	12.9	19900	13000	240000	3.6			N	22
RFJ	700	10	12.2	24400	20490	159000	1.78			S	0
FRE	334	10	14.2	25160	18200	122000	4.26			N	73
JFS	341	75	12.9	98400	39800	107000	11.9			N	8
EEE	NR	8	11.6	15700	11618	120000	5.4	16.42		S	
JNA	NR	NR	14.1	65490	55600	186000	NR			N	16
NMSL	357	8	11.1	158400	123500	145000	3.16			S	14
MAAG	256	18	11.3	36400	29800	203000	5.27			S	4
GC	410	13	13.4	187000	134640	158000	20.6			S	0
BF	NR	8	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	S	0
FA	408	34	8.8	20140	17340	9000	15.41			S	0
EBM	386	9	11.8	12710	10440	116000	5.22			N	8
AM	373	4	11.1	12370	8830	65000	2.96			S	0
LAM	467	32	10.5	39730	30480	170000	12			S	2